



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RUBENS SPIN NETO

***ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓLOGOS EM HUMANOS:
AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, TOMOGRÁFICA,
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE SUA
INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE
OSSEOINTEGRAR IMPLANTES***

ARARAQUARA
2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RUBENS SPIN NETO

*ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓLOGOS EM HUMANOS:
AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, TOMOGRÁFICA,
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE SUA
INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE
OSSEOINTEGRAR IMPLANTES*

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA,
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO" PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
ODONTOLOGIA.

Orientador: *Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior*

Co-orientador: *Prof. Dr. Luís Antônio Violin D. Pereira*

ARARAQUARA
2011

RUBENS SPIN NETO

**ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓLOGOS EM HUMANOS: AVALIAÇÃO
IMUNOLÓGICA, TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA
DE SUA INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE OSSEOINTEGRAR
IMPLANTES**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

2º Examinador: Profª Drª Gulnara Scaf

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

4º Examinador: Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima

5º Examinador: Prof. Dr. Luiz Antonio Salata

Araraquara, 19 de setembro de 2011.

DADOS CURRICULARES

Rubens Spin Neto

NASCIMENTO 16 de Junho de 1981 – Bauru / SP

FILIAÇÃO Rubens Spin Filho
Sueli Francisca de Castro Spin

Curso técnico em Processamento de Dados
1996-1998 Colégio Técnico Industrial “Isaac Portal Roldán” - Bauru
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Graduação em Odontologia
2001-2004 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado
2006-2008 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

- 2008-2011** Pós-graduação em Odontologia – Nível de Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP
- 2010-2011** Pós-graduação – Doutorado “Sanduíche”
Departamento de Radiologia Oral, Dental School
Aarhus University, Dinamarca

Dedicatória

À **Deus**, por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, guiando-me por caminhos desafiadores, porém seguros, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada. Nunca uma porta me foi fechada sem que houvesse outra pronta para ser aberta.

Aos meus pais **Rubens e Sueli**, por terem me gerado, pela criação baseada no exemplo, pautada no exercício da compaixão, e pelas broncas dadas na hora certa, que me mostraram que a liberdade é a recompensa da disciplina, o que me ensinou a ser responsável, sem ser amargo. Pelo incentivo, pela dedicação e pelo amor com que me transformaram em um homem que conhece o valor das palavras respeito e humildade. Meu amor, gratidão e admiração por vocês são inacabáveis.

Ao meu irmão **José Rodolfo**, por entender sem cobranças que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade têm laços inquebráveis.

À minha noiva **Carol**, por ter desde o primeiro momento entendido e respeitado minha dedicação à profissão que eu escolhi, me apoiando e incentivando sempre, mesmo que para isso soubesse que eu trocava sua

companhia por livros e artigos por mais algumas horas, ou que cruzaria o oceano e me ausentaria por alguns meses. Tudo o que colhi nos últimos seis anos de minha vida está diretamente relacionado à sua presença em minha vida, e o amor que temos um pelo outro. Temos ainda muito para colher juntos.

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, pela confiança em mim depositada desde o primeiro momento de trabalho em conjunto, e por guiar meu trabalho de maneira generosa e paciente, oferecendo-me novos desafios e ajudando-me a vencê-los, durante esses últimos 8 anos. Seus conselhos, profissionais e pessoais, farão sempre parte de minha índole. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira**, pelos conselhos profissionais e pessoais, e pelo comprometimento e sinceridade ao longo de todo o processo de desenvolvimento deste estudo.

À **Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, por ter sido a pessoa que me apresentou à Periodontia, abrindo as portas para que eu chegasse cumprisse minha jornada até o Doutorado, pelo apoio, carinho e atenção dispensada em todos os momentos onde sua ajuda foi imprescindível.

À **Prof^a. Dr^a. Ann Wenzel**, ao **Prof. Dr. Andreas Stavropoulos** e ao **Sr. Erick Gottfredsen**, por toda a receptividade em minha estada na Aarhus University, e por todo o apoio pessoal e profissional que ajudaram não só no desenvolvimento deste estudo, mas que serão também de grande valia no decorrer de minha vida.

Ao **Prof. Dr. Elcio Marcantonio**, por todos os ensinamentos passados ao longo dos últimos cinco anos. Seu exemplo estará sempre presente ao longo de minha vida. Muito obrigado por tudo.

Ao doutorando **Felipe Leite Coletti**, pela amizade e colaboração em todos os momentos deste trabalho. Espero ter sido capaz de representar de maneira justa os esforços por você depositados na realização desta pesquisa. Muito obrigado!

À **Regina Lúcia**, pela paciência inacabável, cooperação imensurável e carinho irrefutável, durante todos os momentos aonde sua ajuda foi essencial, desde a Graduação.

Ao **S. Sidnei**, à **D. Izilda**, à **Cássia** e ao **Luciano**, pela amizade, carinho, pelos conselhos e pelo respeito. Espero ser capaz de demonstrar sempre a reciprocidade de todos esses sentimentos.

Aos eternos amigos do GEBO (Grupo de Estudos em Biologia Óssea), **Frank Ykeda**, **Hermes Pretel**, **Pedro Souza**, **Humberto Schwartz Filho** e **Hewerson Tavares**, pelo companheirismo pessoal e profissional e pela presença agradável em todos os momentos, fossem eles de concentração ou de descontração. A amizade de vocês é imprescindível.

Aos amigos **Rafael Faeda**, **Ricardo Andrés Landazuri**, **Wagner Nunes de Paula**, **Rubens Moreno de Freitas**, **Humberto Oswaldo**

Schwartz Filho, Lucas Amaral Fontanari, Guilherme de Oliveira, e João Paulo Chaves de Souza, pelo companheirismo e amizade sincera.

Pessoas como vocês são raras. Obrigado pela força!

Aos **pacientes** que participaram desta pesquisa. Espero que o respeito e ética por mim dispensados em cada uma das linhas aqui escritas reflitam a doação imensurável feita por vocês à Ciência.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Montandon Barreto.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof^a Dr^a Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

À Claudinha e ao Leandro, pela ajuda preciosa na confecção dos cortes histológicos apresentados neste trabalho. Muito obrigado pela dedicação!

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Regina Lúcia, Cláudia, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé) e Esther, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitou a realização desse trabalho.

Aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Aos amigos do curso de Pós-graduação, Ana Lúcia (Naná), Andrés, Humberto, Marina, Roberta, Rodrigo, Sabrina, Shelon, Wagner e Yeon, pela amizade sincera e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar.

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho, por permitir e subsidiar minha vida em Araraquara.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

“A Educação é, portanto, a arte que se propõe este fim, a conversão da alma, e que procura os meios mais fáceis e mais eficazes de operá-la; ela não consiste em dar a vista ao órgão da alma, pois que este já o possui; mas como ele está mal disposto e não olha para onde deveria, a Educação se esforça para levá-lo à boa direção.”

Platão

SUMÁRIO

Resumo	15
Abstract	17
1 Introdução	19
2 Revisão de literatura	22
Capítulo de livro	23
Artigo 1	32
Artigo 2	38
3 Proposição	46
4 Material e método	47
4.1 Estudo piloto	47
4.1.1 Amostra	47
4.1.2 Procedimentos cirúrgicos	48
4.1.3 Instalação de implantes e obtenção das biópsias	50
4.1.4 Processamento das biópsias e avaliação histológica	51
4.2 Estudo principal	54

4.2.1 Amostra _____	54
4.2.2 Procedimentos cirúrgicos _____	56
4.2.3 Instalação de implantes e obtenção das biópsias _____	58
4.2.4 Proces. das biópsias, aval. histológica e histomorfométrica _____	61
4.2.5 Avaliação tomográfica _____	62
4.2.6 Avaliação hematológica e sorológica _____	66
4.2.7 Análise estatística _____	68
 5 Resultado _____	 69
Artigo 1 _____	71
Artigo 2 _____	79
Artigo 3 _____	105
Artigo 4 _____	113
Artigo 5 _____	137
Artigo 6 _____	146
 6 Discussão _____	 169
 7 Conclusão _____	 177
 8 Referências _____	 179
 Anexos _____	 187

Spin Neto R. Enxertos ósseos homólogos em humanos: Avaliação imunológica, tomográfica, histológica e histomorfométrica de sua incorporação e capacidade de osseointegrar implantes. [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar, em humanos, a incorporação do enxerto ósseo homólogo e sua capacidade de osseointegrar implantes de titânio, por meio de análise tomográfica, histológica e histomorfométrica, além de fazer uma avaliação imunológica sistêmica, buscando fatores que indiquem a ocorrência de resposta imune contra esses enxertos, seguindo sua implantação. Para tal foram avaliados 35 pacientes, sendo que 15 foram submetidos a enxertos ósseos autólogos e 20 a enxertos ósseos homólogos, que passaram por avaliação tomográfica (antes, imediatamente após e seis meses depois da realização desses enxertos), por exames imunológicos (hemograma associado às dosagens séricas de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10) anteriormente, e 15, 30 90 e 180 dias após a realização dos enxertos e nos quais foram feitas biópsias, tanto do tecido ósseo (no momento da reabertura dos enxertos para instalação dos implantes) quanto do tecido ósseo com um mini-implante instalado (biopsiado no momento da reabertura da região para instalação de cicatrizadores). Os resultados demonstraram remodelação mais lenta do biomaterial homólogo, em comparação ao autólogo, associada a um maior índice de reabsorção nos seis primeiros meses pós-enxertia, sem

alterações hematológicas ou sorológicas relevantes. Os parâmetros associados à osseointegração dos mini-implantes (contato osso implante e área óssea entre as roscas) também foram semelhantes entre os dois grupos tratados. Conclui-se que, dentro das condições experimentais deste estudo, o enxerto ósseo homólogo mostrou-se inferior ao enxerto ósseo autólogo, com processo de incorporação mais lenta, também relacionado a uma maior reabsorção óssea radiográfica, aos seis meses pós-enxertia, e sem alterações hematológicas ou sorológicas significativas. A avaliação, em curto prazo, dos parâmetros relacionados à osseointegração também demonstrou similaridade entre os grupos estudados.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis; osso homólogo; regeneração óssea; implantes osseointegrados.

Spin Neto R. Fresh-frozen allogeneic bone grafts in humans: Immunological, tomographic, histological and histomorphometrical evaluation of its remodeling and capacity of implants osseointegration [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate, in humans, fresh-frozen allogeneic bone grafts incorporation and its capacity of implants osseointegration, using tomographic, histological and histomorphometric evaluation, also looking for signs of systemic immune reaction toward these grafts. For this, we evaluated 35 patients, 15 treated with autologous bone grafts and 20 with fresh-frozen allogeneic bone grafts, who underwent CBCT evaluation (before, immediately after and six months after the completion of these grafts), immunological tests (blood count associated with serum TNF- α , IFN- γ , IL-1 β and IL-10), before and 15, 30, 90 and 180 days after the graft, and in whom biopsies were taken from both the bone (at the time of reopening grafts for installation of the implants) and the bone tissue with a mini-implant installed (biopsied at the time of reopening the area for installation of healing abutments). Results showed a slower remodeling rate for fresh-frozen allogeneic bone grafts, compared to the autologous material, associated with a higher resorption rate in the first six months post-grafting, with no significant hematological or serum alteration. The parameters associated with mini-implants

osseointegration (bone-to-implant contact and bone area between the threads) were also similar between the two studied groups. We conclude that, under the experimental conditions of this study, the fresh-frozen allogeneic bone grafts proved to be inferior to autologous bone graft, with a lower incorporation process, and an increased resorption six months post-grafting, with no significant alterations in blood cell populations or sera. The short term assessment of the parameters related to osseointegration also showed similarity between the groups.

Keywords: Biocompatible materials; fresh-frozen bone allografts; bone regeneration; homologous bone; osseointegrated implants.

1 INTRODUÇÃO

Diversas técnicas têm sido usadas na tentativa de corrigir defeitos ósseos no complexo maxilo-facial⁵⁴ e, dentre elas, o enxerto ósseo autólogo se mantém como o método mais previsível e melhor documentado, sendo portanto considerado o método padrão para a correção desse tipo de defeito.⁹ O grande problema, porém, é que tal biomaterial, além de associado com morbidade, dor e perda de função temporária, também apresenta quantidade limitada, de acordo com a anatomia da região doadora, além da necessidade da criação de uma área cirúrgica adicional^{37, 49}.

Apesar de haver uma grande variedade de biomateriais que possam ser utilizados como substitutos ósseos já disponíveis no mercado, fator associado ainda a um avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que traga todas as qualidades, porém sem as limitações, do osso autólogo, e esse é o principal fator que movimenta a busca por novos biomateriais, de outras origens.

O uso de tecido ósseo proveniente de bancos de tecidos, também conhecido como enxerto homólogo ou fresco congelado, tem aumentado nos últimos anos. A indicação desse tipo de biomaterial ocorre quando há ausência de osso autólogo para captação, ou em casos aonde o paciente apresenta resistência frente à necessidade de manipulação de um

segundo leito cirúrgico para captação do biomaterial, atividade essa freqüentemente associada a problemas na fase pós-operatória, tais como deiscência de sutura, dor e infecção³⁷.

Vantagens como facilidade de obtenção em quantidade desejada, redução do tempo cirúrgico e a não necessidade da manipulação de uma segunda área cirúrgica tornam o osso homólogo, captado junto a bancos de tecido, uma alternativa viável nas cirurgias de reconstrução óssea prévias a reabilitação com implantes osseointegráveis³⁶. Acredita-se que este biomaterial atue como uma plataforma para a neo-formação óssea, agindo preferencialmente como osteocondutor, e talvez como osteoindutor³⁸.

Quando comparado ao enxerto autólogo, o enxerto homólogo apresenta capacidade de revascularização e remodelação mais lentas, e a união entre o leito receptor e o enxerto é obtida de forma consistente, porém não uniforme⁷. A maior demanda de tempo necessário para remodelação, a necessidade de respeito absoluto aos protocolos de captação e processamento, para que não ocorra contaminação e o fator psicológico de se utilizar um material obtido de cadáveres são as desvantagens desse tipo de biomaterial enfocadas na literatura⁴.

A Portaria GM/MS nº 1686, de 20/09/2002, aprovou as normas para autorização de funcionamento e cadastramento de bancos de tecidos músculo-esqueléticos, porém, ainda é pequeno o número de bancos de tecido músculo-esqueléticos já em funcionamento (no Brasil,

até o momento, são apenas seis com funcionamento autorizado). Nas instituições autorizadas para tal fim, a seleção dos doadores, bem como o processo de captação, armazenamento e estocagem do enxerto homólogo são realizadas de forma criteriosa, seguindo normas da Associação Americana de Banco de Tecidos (AATB), a fim de diminuir a antigenicidade, transmissão de doenças, infecções e outras complicações que possam advir desse procedimento²⁰.

Além disso, embora o conceito de osseointegração⁵ esteja vastamente difundido no meio científico, trabalhos correlacionando a instalação de implantes em áreas previamente preenchidas por biomateriais homólogos e a osseointegração alcançada por esses implantes, de maneira criteriosa, são poucos e inconclusivos^{27, 34}.

Frente a isso, fica nítida a necessidade de esclarecimentos sobre o comportamento biológico do enxerto ósseo homólogo e também das características da osseointegração de implantes de Titânio sobre esses enxertos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura desta Tese é apresentada na forma de um capítulo de livro e dois artigos científicos, a seguir:

Capítulo de livro:

Spin-Neto R, Schwartz-Filho HO, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Terapêutica periodontal regenerativa: técnicas cirúrgicas, biomateriais e fatores de crescimento transformando o periodontista em engenheiro tecidual. In: Tunes UR, Dourado M, Bittencourt S. Avanços em Periodontia e Implantodontia - paradigmas e desafios. Nova Odessa: Ed. Napoleão; 2011. p. 560-76.

Artigo 1:

Spin-Neto R, del Barrio RAL, Coletti FL, Marcantonio E, Marcantonio E Jr. Tecido ósseo homólogo para utilização em Odontologia: revisão de literatura. Implant News. 2010;7:555-60.

Artigo 2:

Spin-Neto R, Gotfredsen E, Marcantonio Jr E, Wenzel A. Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. J Digit Imaging. 2011 Mar 30 [Epub ahead of print].

capítulo 25

TERAPÊUTICA PERIODONTAL REGENERATIVA: TÉCNICAS CIRÚRGICAS, BIOMATERIAIS E FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMANDO O PERIODONTISTA EM ENGENHEIRO TECIDUAL

► Rubens Spin-Neto ► Humberto Osvaldo Schwartz Filho ► Elcio Marcantonio Jr. ► Rosemary Adriana C. Marcantonio

O conceito de sucesso em Periodontia sofreu consideráveis modificações ao longo das últimas décadas. A ciência que no passado se preocupava basicamente em conter o processo infeccioso que levava à destruição dos tecidos de suporte dentário e em manter em função os dentes afetados por essa perda de suporte, tem enfrentado novos desafios a cada novo caso tratado.

Os conceitos multifatoriais sobre a dinâmica da doença periodontal já estão bem estabelecidos, e a literatura nos traz novos dados não só sobre como controlar o agente etiológico principal dessa patologia (o biofilme), mas também sobre as interações entre hospedeiro e biofilme que levam à perda dos tecidos. Esses conceitos têm feito que o diagnóstico das doenças periodontais se torne mais preciso e precoce, permitindo que o periodontista atue inserido no contexto de promoção de saúde, e não apenas no tratamento da doença.

Apesar disso, seria utópico não encontrar, em qualquer população que se deseje estudar, dentes em que o processo de perda de tecidos periodontais já tenha se instalado. Dessa maneira, fica evidente que tão importante quanto prevenir, diagnosticar e tratar a doença periodontal ativa, é devolver aos pacientes o tecido de suporte que já foi perdido em decorrência dessa doença, e juntamente com isso devolver também função e estética às áreas afetadas. E são exatamente essas duas palavras (função e estética) que têm levado a ciência (e, por consequência, a clínica) periodontal a um novo rumo – o da regeneração das estruturas teciduais perdidas no curso de progressão da doença.

Importante nessa fase é que se mantenha o foco na palavra “regeneração”, e em tudo que ela representa em termos de resultados clínicos e biológicos. Tendo em vista que nosso foco é o ressarcimento da forma e função originais dos tecidos do paciente, o conceito de regeneração mostra-se como nosso real objetivo, em detrimento do conceito já ultrapassado de “reparo tecidual”, em que ocorria a formação de tecidos cicatriciais incapazes de devolver a arquitetura anatômica e morfofisiológica ao periodonto⁽¹⁾.

Recorrendo à literatura, sabemos que os protocolos cirúrgicos convencionais, tais como a raspagem e alisamento radicular com o uso de retalhos para exposição das áreas afetadas, levam a uma substituição dos tecidos periodontais perdidos por um epitélio junctional longo, sem que existam tecidos de suporte entre esse epitélio e a raiz dentária, o que prejudica até mesmo o prognóstico desse dente ao longo do tempo⁽²⁻⁴⁾. Em contrapartida a esse conceito, a regeneração periodontal tem sua base na neo-formação do aparato de inserção dentário perdido, com a presença de osso, cimento e ligamento periodontal, com organização fisiológica e morfológica capazes de sustentar a função e estética já abordadas.

A regeneração tecidual tem seus alicerces em alguns pontos básicos: a criação e manutenção de um espaço físico onde possa haver a formação tecidual, espaço esse livre de tecidos e células indesejáveis, e onde haja a proteção do coágulo sanguíneo adjacente, tudo isso mecanicamente estável, de modo a favorecer a ocorrência de vascularização e, por consequência, regeneração. Para garantir que esses parâmetros fossem alcançados, os clínicos lançaram mão de arcabouços que guiassem o crescimento tecidual e de membranas de proteção que conferissem ao sítio tratado essas características, dando início à aplicação dos biomateriais na regeneração tecidual⁽⁵⁾.

Tais biomateriais, basicamente os enxertos ósseos ou enxertos com substitutos ósseos, atuam fornecendo

organização estrutural para que possa haver regeneração tecidual, conduzindo o crescimento dos tecidos na região defeituosa e, com isso, favorecendo a vascularização essencial para ocorrência da regeneração⁽⁶⁾. Atualmente, muito se tem discutido sobre biomateriais capazes não só de conduzir o crescimento tecidual, como também de induzir e amplificar esse crescimento, com o auxílio de fatores de crescimento ou mesmo de células viáveis que possam ser inseridas no defeito a ser regenerado durante o ato cirúrgico. Podemos dizer que estamos entrando em uma nova era na pesquisa relacionada aos biomateriais, na qual variações físicas, químicas e moleculares são discutidas de forma que tais biomateriais sejam cada vez mais personalizados e funcionais, de acordo com o tipo de tecido a ser regenerado, em cada aplicação específica^(7,8).

A soma dos conceitos de regeneração tecidual aos conhecimentos crescentes sobre a ciência dos biomateriais deu origem a um novo paradigma em relação à reconstrução de tecidos perdidos em nosso organismo – a engenharia tecidual. Em um artigo de revisão de literatura apresentado por Langer & Vacanti em 1993⁽⁹⁾, o estabelecimento dos critérios relacionados à engenharia tecidual de uma maneira simples e direta fez que tal tema passasse a ser visto como um objetivo plausível dentro de nossa prática clínica, e a tríade biomateriais, células e fatores de crescimento tornou-se cada vez mais presente nos relatos que os cirurgiões-dentistas encontram na literatura especializada.

O propósito da engenharia tecidual é muito claro – estabelecer novos protocolos clínicos para o tratamento e regeneração dos defeitos antes considerados de prognóstico duvidoso. Aliado a isso, tais protocolos preferencialmente devem desviar dos problemas de baixa biocompatibilidade ou funcionalidade das opções terapêuticas antes disponíveis. Essa característica faz que a engenharia tecidual seja vista, hoje, como o objetivo final e ideal dos tratamentos clínicos.⁽¹⁰⁾

Neste capítulo, propomo-nos a fornecer uma breve revisão da literatura a respeito da engenharia tecidual relacionada à clínica periodontal, abordando temas como biomateriais, fatores de crescimento e as diferentes técnicas cirúrgicas associadas a esse tema, mantendo um foco crítico em relação às opções terapêuticas que estarão disponíveis ao clínico nos próximos anos.

BIOMATERIAIS

A definição clássica do termo biomaterial está pautada no conceito de que são os materiais utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico. Em suma, podemos dizer que um biomaterial compreende uma substância ou combinação de substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, utilizadas com a finalidade de tratar, substituir ou aumentar a matéria viva (órgãos ou tecidos) cuja função foi perdida, e que podem ser usado tanto de maneira transitória como definitiva.⁽¹¹⁾

Para que o biomaterial execute sua função biológica com sucesso, deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e, para tanto, deve possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente.⁽¹²⁾ Espera-se, ainda, que o biomaterial não seja carcinogênico ou pirogênico, apresente estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica adequadas, e que tenha custo compatível com sua aplicação.⁽¹³⁾

Apesar de haver uma grande variedade de biomateriais substitutos ósseos, associada a um avanço crescente em

seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses requisitos de maneira satisfatória.⁽¹¹⁾

Artigos científicos sobre defeitos ósseos criados experimentalmente e preenchidos com biomateriais são bastante comuns na literatura. Ponto pacífico nesses artigos seria o fato de que um biomaterial ideal para implante ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não deve induzir resposta imunológica e deve estar disponível em quantidades suficientes. Deve, ainda, ser capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo ao mesmo tempo gradualmente absorvível, fornecendo um suporte condutivo para formação de um novo osso. Adicionalmente, o material deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito.⁽¹⁴⁾

Uma das maneiras clássicas de classificar os biomateriais é pautada em seu princípio de atuação, ou seja, no efeito que se espera que tais materiais provoquem no tecido ósseo, culminando na incorporação estrutural do material enxertado ao leito receptor.⁽¹⁵⁾ Nessa linha de pensamento, existem três subdivisões:

► **Materiais osteocondutores:** são aqueles materiais que atuam como substrato para neoformação óssea, sem induzir modificações celulares ou estimular a formação de novas células. Um bom osteocondutor oferecerá uma estrutura tridimensional para que haja invaginação do tecido vascular e das células mesenquimais indiferenciadas no interior de seu arcabouço, facilitando e garantindo a organização tecidual de maneira rápida e funcional, resultando na formação de uma nova matriz óssea.^(15,16) Uma característica marcante dos biomateriais tidos como osteocondutores é que sua implantação em sítios não ósseos não provoca a formação de tecido mineralizado. Exemplos de materiais osteocondutores são os enxertos autógenos, homogêneos e alguns biomateriais cerâmicos como o β -TCP

► **Materiais osteoindutores:** materiais com a capacidade de recrutar e induzir a diferenciação de células ainda indiferenciadas em osteoblastos. Com isso em mente, podemos definir que um material osteoindutor verdadeiro

terá a capacidade de levar à formação de tecido mineralizado mesmo quando implantados em sítios não ósseos.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Isso se deve à ação de fatores de crescimento presentes no próprio enxerto, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e especialmente as proteínas morfogenéticas ósseas, também chamadas de BMPs.^(15,20,21) Os biomateriais autógenos apresentam certa capacidade osteoindutora, porém, nos últimos anos novos biomateriais, basicamente uma associação de membranas de colágeno e BMP, têm feito da osteoindução uma realidade clínica palpável.^(22,23)

► **Materiais osteogênicos:** são aqueles materiais que possuem osteoblastos ou demais células osteoprogenitoras viáveis, apresentando a capacidade de levar a ossificação direta.⁽²⁴⁾ Esse princípio de atuação é dependente da sobrevivência de tais células ao transplante, dependendo da manutenção de sua nutrição.⁽¹⁵⁾ De acordo com a literatura, aquelas células localizadas dentro de um raio de 300 μ m de uma fonte sanguínea no período inicial de cicatrização, ou seja, antes da revascularização do enxerto, são as que apresentam reais chances de sobrevivência, sendo que as fontes celulares para essa neoformação tecidual encontram-se principalmente na medula óssea e no periosteio.^(25,26) O melhor exemplo de biomaterial com características osteogênicas continua sendo o osso autógeno.

Nos últimos anos, mudanças tecnológicas na produção dos biomateriais e na obtenção dos substitutos ósseos buscam conferir a esses materiais características de osteoindução, osteocondução ou osteogênese, e esses fatores são o grande foco atual da bioengenharia.^(19,27,28)

Segundo a linha da classificação dos biomateriais, eles podem ainda ser classificados como bioestáveis (permanentes, utilizados na substituição por tempo indeterminado de um tecido lesado, devendo possuir características mecânicas e físico-químicas compatíveis com tal função) e bioabsorvíveis (temporários, substituindo tecidos que necessitam de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo).⁽²⁹⁾

TERAPÊUTICA PERIODONTAL REGENERATIVA

Há, ainda, outra classificação que pode ser utilizada para os biomateriais, em função das características físico-químicas resultantes do seu processamento; classifica os biomateriais em orgânicos e inorgânicos. Por exemplo, o osso, geralmente bovino, é desmineralizado em condições controladas de pH e temperatura removendo-se os componentes inorgânicos e celulares, restando predominantemente colágeno tipo I e, algumas vezes, resíduos de fatores de crescimento. O material inorgânico é obtido por meio da desproteinização do osso por processos termoquímicos que removem sua porção orgânica, restando fundamentalmente hidroxiapatita (HA).⁽²⁸⁾

Apesar de todas as classificações apresentadas até o momento, a literatura demonstra que a maneira mais aceita de dividir os biomateriais em grupos tem base em sua origem. Os biomateriais para implante e enxertia podem ser classificados de acordo com sua origem em quatro grandes famílias: autógenos ou autólogos; homogêneos ou homólogos, aloplásticos e xenogênicos.^(30,31)

O biomaterial autógeno é obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo. O homogêneo é obtido de indivíduos da mesma espécie do receptor; os xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos, e finalmente os aloplásticos podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica.^(11,30,31) Biomateriais metálicos são aqueles que apresentam, quando na forma sólida, ligações metálicas em sua composição. Já os cerâmicos são aqueles obtidos pelo cozimento ou queima de minerais não metálicos, ao passo que os poliméricos seriam compostos formados pela combinação de unidades menores, unidas por ligações covalentes, formando macromoléculas, tais como a quitosana.⁽¹¹⁾

O enxerto autólogo é considerado o padrão-ouro atualmente, e é largamente empregado quando da necessidade de aumento do volume ósseo, visto que é o biomaterial que mais se aproxima de apresentar propriedades desejáveis como osteogênese, osteocondução e osteoindução, simultaneamente.⁽³²⁾ Além disso, por ter origem no mesmo indivíduo que irá receber o enxerto, a aceitação do procedimento pelo organismo torna-se facilitada, sem risco de rejeição. Contudo, inconvenientes dessa técnica podem

ser descritos, como a necessidade de internação em alguns casos, necessidade de criação de uma segunda área cirúrgica, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante.⁽²⁸⁾ Nem sempre a obtenção de quantidade e qualidade adequadas de osso autógeno é simples, e os inconvenientes citados anteriormente podem desencorajar o paciente à realização do procedimento.

O tecido osso autógeno pode ser obtido de áreas intra-orais, como a sínfise e ramo mandibular, o processo coronoide e a tuberosidade maxilar, bem como de sítios extra-orais, dos quais os mais utilizados são a calvária e a crista ilíaca (anterior e posterior), de acordo com a literatura.^(33,34) Clinicamente, em decorrência das diferenças em relação à morbidade da área doadora, volume de osso obtido e taxa de reabsorção do enxerto, a escolha da área doadora deve ser feita com base em critérios como o volume de osso necessário para a reconstrução, morbidade mínima do sítio doador, o padrão ósseo do enxerto (cortical/medular), a proximidade com o leito receptor, facilidade de remoção e manipulação do enxerto, além de uma taxa de reabsorção que seja a menor possível.⁽³²⁾

O padrão de incorporação biológica dos enxertos ósseos autógenos também está relacionado ao padrão ósseo utilizado. Os enxertos corticais apresentam um conteúdo celular reduzido e elevado grau de densidade e compactação da matriz óssea orgânica e inorgânica, o que lhes confere boas características estruturais em detrimento de propriedades biológicas reduzidas, como, por exemplo, revascularização mais lenta quando comparados ao osso medular e menor componente celular, levando a um processo de remodelação mais lento.^(35,36) O **osso medular**, devido a sua organização tridimensional esponjosa, com baixa densidade e alto componente celular, embora ofereça um menor suporte estrutural em relação ao osso cortical no momento do transplante, possui um maior potencial de revascularização, e, portanto, de integração ao leito receptor em um menor período de tempo.⁽³⁷⁾ Com isso em vista, fica nítido que a associação de material córtico-medular faz o tecido apresentar as vantagens de cada padrão ósseo isoladamente, como a rápida incorporação associada a um suporte estrutural imediato.⁽³⁸⁾

Muito se discute sobre a importância da origem embrionária dos enxertos ósseos em relação ao seu comportamento biológico, embora esse ainda seja um tópico controverso na literatura, visto que embora alguns autores afirmem que o tecido ósseo de origem intramembranosa apresenta menores taxas de reabsorção e maior velocidade de revascularização em comparação aos ossos de origem endocondral, ainda não existem evidências científicas suficientes para suportar essa informação.⁽³⁶⁾

Dentre os biomateriais que têm sido propostos na literatura atual, podemos citar também os polímeros naturais, já há muito tempo estudados, mas ainda com resultados bastante variados. Estudos que utilizam biopolímeros como substitutos ósseos vão desde o uso de géis de quitosana, extraída da casca de camarões⁽³⁹⁾, até polímeros produzidos com colágeno para uso como *scaffolds* de três dimensões, utilizados em engenharia tecidual⁽⁴⁰⁾, passando por diversas outras substâncias, como o metil-metacrilato⁽⁴¹⁾, Bis-GMA, polímero de mamona⁽⁴²⁾, entre outros.⁽⁴³⁾ Esses polímeros são, muitas vezes, agregados a outras substâncias, normalmente minerais, capazes de aumentar sua resistência mecânica, compatibilizar seu tempo de reabsorção à velocidade de formação óssea e favorecendo o aumento de sua viscosidade, facilitando seu uso. Atualmente, os minerais mais citados para essa finalidade são os biovidros e o fosfato tricálcio.⁽⁴⁴⁾

Há também o osso homólogo, ou homogêneo, obtido de bancos de tecido músculo-esquelético. O uso desse biomaterial aumentou 15 vezes durante a última década, se somadas suas aplicações em Ortopedia e Odontologia.⁽⁴⁵⁾ O aumento na demanda por este material fez que o número de fornecedores capacitados também aumentasse, e hoje é possível até mesmo obter fragmentos ósseos personalizados, moldados especificamente para o defeito que desejamos preencher.⁽⁴⁶⁾

O uso de enxertos homólogos, obtidos de bancos de tecidos, tornou-se particularmente comum em cirurgias ortopédicas, que demanda blocos ósseos extensos, utilizados no tratamento de lesões tibiais, femorais, colunares, entre outras.⁽⁴⁷⁻⁵²⁾ Mais recentemente, o uso desse tipo de biomaterial em Odontologia também tem se tornado corriqueiro,

principalmente nas cirurgias prévias à colocação de implantes, buscando aumento de espessura e altura ósseas.⁽⁵³⁻⁶⁰⁾

Normalmente, blocos ósseos congelados obtidos da região femoral ou patelar são utilizados, sendo que a obtenção desse material deve ser feita em bancos de tecido com segurança garantida, preferencialmente daqueles que seguem os protocolos de obtenção e processamento preconizados e certificados pela Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB), ou ainda da Associação Europeia de Transplantes Músculo-Esqueléticos (EAMST).⁽⁶¹⁻⁶⁸⁾

Há relatos na literatura do uso de osso homólogo desde o início do século XIX, no entanto, foi o estabelecimento de bancos de tecido músculo-esqueléticos, a partir da década de 1950, que formalizou o uso desse biomaterial.⁽⁶⁹⁾ Anteriormente ao desenvolvimento das tecnologias de bancos de tecidos, o osso homólogo era utilizado fresco, assim como obtido do cadáver ou de um doador vivo, embora, nesses casos, riscos de contaminação ou rejeição devido a reações imunológicas fossem aumentados, diminuindo as taxas de sucesso do tratamento. Atualmente, os componentes celulares dos homoenxertos são removidos ou mortos, na tentativa de prevenir a ocorrência de rejeição.⁽⁷⁰⁾

Embora existente, o risco de transmissão de doenças por meio desse biomaterial é reduzido por seu processamento (o material é obtido fresco, tem todo o conteúdo celular removido por centrifugação e congelamento a baixíssima temperatura), porém, esse mesmo processamento causa deterioração de suas propriedades biológicas, por diminuir sua resistência mecânica e eliminar toda a fase celular do tecido, que é, portanto, considerado primariamente osteocondutor, com pouca capacidade osteoindutiva. Apesar disso, seu uso clínico tem aumentado e resultados preliminares demonstram que, apesar de apresentar um processo de remodelação mais lento, esse biomaterial pode ser usado na regeneração de defeitos ósseos.⁽⁷¹⁻⁷³⁾ Dados relacionando, quantitativa ou qualitativamente, a capacidade de implantes de titânio de osseointegrar-se em regiões enxertadas com osso homólogo ainda são inexistentes na literatura.

Seguindo a implantação de um enxerto homólogo, há um enorme número de processos que ocorrem causando sua

integração e remodelação. Isso é iniciado por uma reação inflamatória, a partir da qual as regiões necróticas do tecido implantado começam a ser reabsorvidas, criando espaços que permitam sua invasão por vasos sanguíneos, e a chegada das células responsáveis pelo metabolismo ósseo (osteoclastos e osteoblastos), responsáveis pela remodelação da região, que vai ocorrer gradativamente. Os osteoclastos degradarão a matriz óssea homóloga enxertada, ao passo que os osteoblastos secretarão osso novo, sempre de uma maneira progressiva, em um termo conhecido atualmente como *creeping substitution*. Finalmente, o enxerto homólogo é completamente remodelado e substituído por osso novo, porém, o tempo exato que essa finalização levará para ocorrer é indeterminado, visto que é dependente de vários fatores, como o tipo do enxerto utilizado (cortical ou esponjoso), a vascularização do leito receptor e a quantidade de material necrótico a ser remodelado; alguns autores relatam que essa remodelação completa pode até mesmo não ocorrer durante o período de vida do receptor, tão longo o processo.^(73,74)

Existem diversas configurações de osso homólogo disponíveis atualmente, incluindo osso particulado, pastilhas de cortical óssea, cubos de osso esponjoso e cubos mistos (com osso esponjoso e cortical), sendo que muitas dessas configurações não poderiam nem ao menos ser consideradas se trabalhássemos com osso obtido de origem autóloga, principalmente devido ao comprometimento estrutural que a retirada de tamanhas quantidades de tecido ósseo causaria ao sítio doador. Além disso, o osso homólogo pode ser trabalhado de maneira muito específica, criando blocos esculpidos de forma personalizada, suprimindo a necessidade exata de cada paciente. Já que não existem células ósseas viáveis no osso homólogo processado, ele não possui características osteogênicas. O processamento desse tecido, conforme proposto pela AATB, inclui o debridamento físico para remoção do tecido mole e redução da carga celular, lavagem ultrassônica para remover o restante das células e sangue, a lavagem e centrifugação a baixas temperaturas (-80 °C) para desnaturar as proteínas celulares e causar a inativação de qualquer vírus que possa existir, lavagem com antibióticos (no caso específico do tecido processado para aplicação odontológica, a legislação preconiza o sulfato de gentamicina)

para matar bactérias, corte do tecido ósseo na geometria específica, e esterilização, feita por irradiação gama ou exposição ao óxido de etileno (passo esse optativo), prévios ao seu congelamento e liberação do lote de tecido para distribuição.⁽⁷⁵⁾ Esse processamento faz que a capacidade osseointegradora desse tipo de enxerto seja muito pequena, ou até mesmo inexistente.⁽⁷⁶⁾

Frequentemente o osso homólogo é tratado como um material de receptor universal, já que o potencial imunológico do tecido processado é reduzido por meio dos processos de remoção celular e congelamento. No entanto, estudos em animais da mesma espécie demonstraram que em alguns casos o transplante de tecido ósseo pode deflagrar resposta imunológica, embora sua relevância clínica seja desconhecida. Com isso em mente, e sabendo que a união do enxerto ao leito receptor, e suas características funcionais, dependem da histocompatibilidade entre doador/receptor, alguns estudos verificaram que, em animais, a administração de agentes imunossupressores pode melhorar o desempenho dos enxertos homólogos, em detrimento dos danos sistêmicos causados ao paciente pela medicação utilizada.⁽⁷⁷⁾ Poucos trabalhos retomaram as discussões a respeito da importância do fator imunológico na incorporação dos enxertos homólogos, sendo que as opiniões a esse respeito continuam inconclusivas.

Pela observação da literatura produzida sobre o tema até o momento, observa-se que as taxas de sucesso, entendido pela correta incorporação dos enxertos homólogos, varia entre 60 e 90%, avaliados de maneira clínica e radiográfica, porém na área ortopédica.⁽⁷⁷⁻⁸¹⁾ Já na área odontológica, em que o termo sucesso vai muito além da mera incorporação do enxerto, envolvendo a capacidade do enxerto osseointegrar implantes e, mais ainda, suportar cargas mastigatórias ao longo dos anos, estudos citando taxas de sucesso são ainda inexistentes.

REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA E REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Os princípios biológicos e técnicos da RTG começaram a ser definidos já há algumas décadas, em estudos envolvendo a reconstrução de tendões e de feixes nervosos.⁽⁸²⁻⁸⁴⁾ Mais tarde, a idéia de se isolar um sítio anatómico com o uso de barreiras mecânicas que selecionassem o tipo de célula (e, por consequência, de tecido) que viria a povoar determinada região passou a ser aplicada também em defeitos ósseos maxilofaciais, incluindo os defeitos periodontais.⁽⁸⁵⁻⁹⁰⁾

A consolidação da literatura na área levou ao surgimento de dois termos diferenciados, dependendo do tipo de tecido cujo crescimento se deseja guiar. Aqueles dedicados ao tratamento de defeitos periodontais propriamente ditos continuaram a usar o termo RTG para as descrições das técnicas utilizadas, ao passo que nos estudos em que havia a regeneração de defeitos ósseos não periodontais, passou-se a utilizar a denominação regeneração óssea guiada (ROG) para a técnica.⁽⁹¹⁾

TERAPÊUTICA PERIODONTAL REGENERATIVA

Mantendo nosso foco na RTG, a literatura mostra que tal técnica é capaz de prevenir a migração apical dos tecidos epiteliais e conjuntivos periodontais em sítios em superfícies radiculares acometidas por doença.⁽⁹²⁻⁹⁶⁾ **Isso acontece** porque as membranas utilizadas seriam capazes de prover um espaço físico seguro para a migração de células do ligamento periodontal e de células mesenquimais indiferenciadas em direção à raiz do dente exposta, levando à regeneração do periodonto naquela região.⁽⁹⁷⁻⁹⁸⁾ Além disso, as membranas utilizadas auxiliam na proteção do coágulo sanguíneo durante as fases iniciais da cicatrização e mantêm o espaço físico necessário para que haja a formação de um novo aparato de inserção periodontal, ou seja, conduzindo o crescimento tecidual, porém, sem efeitos indutores ou gênicos sobre as células.⁽⁹⁸⁾

Os estudos atuais têm considerado a RTG em âmbitos diferentes, seja como forma de se obter recobrimento radicular perdido, com um foco mais limitado aos tecidos moles periodontais, ou de uma maneira mais ampla, quando defeitos ósseos também estão presentes e sua regeneração se mostra necessária para o restabelecimento da harmonia periodontal. Na primeira situação, um estudo de revisão sistematizado concluiu que, embora a utilização de RTG sozinha ou associada a biomateriais promova ganho estatisticamente significativo de recobrimento radicular (com interferência inclusive nos níveis de inserção clínica e tecido queratinizado), outras técnicas, tais como os enxertos de tecido conjuntivo subepitelial, levariam a resultados mais expressivos.⁽⁹⁹⁾ Levando em conta também a necessidade da regeneração de defeitos ósseos periodontais, um estudo, também de revisão sistematizada, concluiu que a RTG proporciona melhores resultados quando comparada à raspagem de campo aberto, levando a ganhos mais expressivos de nível de inserção clínica. Nesse caso, a associação de biomateriais às técnicas de RTG proporcionou uma melhora de resultados, quando os defeitos tratados se referiam a áreas de furca.⁽¹⁰⁰⁾

Já para a ROG, podemos dizer que sua indicação é ainda mais vasta frente ao avanço da Implantodontia e da extrema dependência que esta última apresenta de um arcabouço ósseo suficientemente denso e bem estruturado

para suportar os implantes ao longo dos anos. Dessa forma, podemos dizer que a ROG possui aplicações que vão desde a correção de defeitos, como deiscências e fenestrações ósseas ao redor de implantes, até a correção de defeitos ósseos mais amplos, que impeçam sua colocação, ou ainda em sítios afetados por peri-implantite, com índices de sucesso variados de acordo com o tipo de técnica utilizada.^(101, 102)

Fator decisivo para a RTG e a ROG, as membranas utilizadas devem ser também avaliadas de maneira criteriosa. Na técnica regenerativa, após a obtenção de um retalho mucoperiósteo e do debridamento do defeito, a membrana deve ser sempre colocada de forma a recobrir toda a área que se deseja regenerar, excedendo suas margens em pelo menos 2 mm. Na sequência, o retalho é reposicionado sobre a membrana e suturado de maneira invariavelmente oclusiva, criando um ambiente isolado. Para tal, espera-se que as membranas utilizadas exerçam funções tais como a de permeabilidade seletiva (permitindo a passagem de plasma e de nutrientes, e não a passagem de células), biocompatibilidade, suporte físico, manutenção de espaço e prevenção da formação de cicatrizes.

O tipo de membrana utilizada (absorvível ou não absorvível) pode interferir nos resultados obtidos, dependendo da localização e configuração do defeito a ser tratado⁽¹⁰³⁾, mas a heterogeneidade dos estudos abordando esse aspecto mantém esse assunto em pauta de discussão. Ponto pacífico é que para a escolha da membrana, fatores como as suas propriedades físicas (diretamente relacionadas à criação/manutenção de espaço para a ocorrência da regeneração) e, no caso das membranas reabsorvíveis, seu tempo de reabsorção, devem sempre ser considerados. Enquanto as membranas não reabsorvíveis apresentam melhores propriedades físicas, as reabsorvíveis proporcionam uma menor possibilidade de exposição com o tempo, diminuindo, com isso, o risco de contaminação, fator extremamente delicado para o sucesso da técnica.⁽¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾

Quando não expostas, a manutenção da membrana por períodos de tempo mais longos (4 meses para a mandíbula e 6 meses para a maxila) está associada a formação de maior quantidade de tecido ósseo.^(107, 108)

Tão importante quanto a seleção da membrana adequada, a fixação adequada dessas barreiras se mostra como condição *sine qua non* para o sucesso da cicatrização nos sítios tratados, visto que a movimentação da membrana durante essa fase pode influenciar o tecido que será formado.⁽¹⁰⁹⁾ Outros fatores, tais como o hábito de fumar, também aumentam as taxas de insucesso das técnicas de RTG e ROG, devido principalmente às alterações de vascularização que ocorrerão nos tecidos da mucosa oral.⁽¹¹⁰⁾

FATORES DE CRESCIMENTO

Como já abordado previamente, a regeneração das estruturas periodontais constitui um complexo multifatorial, regulado pela interação entre células, matrizes de tecido ou biomateriais, hormônios e fatores de crescimento ou diferenciação. Essas interações deflagram uma série de eventos que levam à neoformação tecidual, porém, por caminhos ainda não totalmente compreendidos pela ciência.⁽¹¹¹⁾ Nos últimos anos, avanços nas técnicas de biologia celular e molecular contribuíram para um melhor entendimento do verdadeiro potencial dos fatores de crescimento como parte da terapia regenerativa periodontal, e diversos fatores de crescimento e diferenciação passaram a ter sua ação sobre o tecido ósseo e periodontal estudados.⁽¹¹²⁾

De uma maneira resumida, os fatores de crescimento são proteínas ou polipeptídeos que regulam e mediam as reações biológicas naturais. Tais substâncias atuam nos eventos de reparo tecidual, tais como proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação e síntese de matriz extracelular, e normalmente agem por meio de sua ligação com receptores específicos presentes na superfície das células-alvo.⁽¹¹³⁾ Exemplos clássicos de fatores de crescimento que têm sido testados em regeneração periodontal são o FGF (fator de crescimento de fibroblastos), o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), o TGF- β (fator de crescimento de transformação β) e o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas). Alguns fatores de crescimento têm sido didaticamente denominados fatores de diferenciação, devido ao tipo de ação que tem sobre os tecidos. Esse é o caso das BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), uma família de proteínas derivadas do TGF- β que age em todas as fases do tecido ósseo,

desde o controle da migração, divisão e diferenciação celular, até a organização do tecido ósseo e controle dos mecanismos de apoptose celular.⁽¹¹⁴⁾

FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGF)

O FGF interfere em uma ampla rede de efeitos biológicos, como mitose, angiogênese e quimiotaxia, agindo em células oriundas dos três folhetos embrionários – endodérmicas, ectodérmicas e mesodérmicas (como as células ósseas, cartilaginosas e do ligamento periodontal). Dessa forma, o FGF se mostra como um fator multifuncional, capaz de induzir a regeneração em uma série de tecidos, como os tecidos periodontais.⁽¹¹⁵⁾

A literatura sugere que o FGF é capaz de estimular de maneira significativa a regeneração do tecido ósseo e periodontal, servindo como terapia adjunta aos procedimentos cirúrgicos convencionais usados para essa finalidade.⁽¹¹⁶⁾ Essa conclusão está pautada em resultados obtidos desde os primeiros estudos com esse fator de crescimento e vem sendo confirmada até os dias atuais. Estudos clássicos, como o de Eppley *et al.*⁽¹¹⁶⁾, que testou essa substância em associação ao enxerto ósseo autógeno em mandíbulas de ratos irradiados, obtendo um bom restabelecimento do contorno ósseo mandibular, com cicatrização melhorada e reduzida taxa de necrose ou sequestro ósseo na área enxertada, tem sido confirmado e complementados em pesquisas recentes.

Por exemplo, um estudo com animais de defeitos intraósseos de três paredes tratados com FGF em diferentes dosagens, associado a técnicas de RTG, demonstrou superioridade do tratamento regenerativo periodontal baseado em FGF quando comparado ao tratamento de RTG isolado, em cães (após 6 semanas) e primatas (após 8 semanas).⁽¹¹⁷⁾ Em humanos, um estudo clínico randomizado controlado de **fase II recente**⁽¹¹⁸⁾ (no qual um amplo número de pacientes é tratado com a mesma técnica ou medicamento, no intuito de se avaliar sua efetividade e a segurança da persistência de seu uso como alternativa terapêutica), no qual 74 pacientes com defeitos intraósseos periodontais de duas ou três paredes foram tratados com uma associação entre biomaterial (gel de hidróxi-propil-celulose) e recombinante

TERAPÊUTICA PERIODONTAL REGENERATIVA

humano (rh) de FGF, obteve resultados positivos, com um aumento significativo na altura do osso alveolar avaliado nove meses após a terapia, sugerindo que tal substância estimula a regeneração periodontal também em humanos.

FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

O PDGF atua ligando-se a receptores existentes na maioria das células de origem mesenquimal, como os osteoblastos, estimulando a ação dessas células em processos regenerativos, como mitose, quimiotaxia e secreção de matriz, além de promover angiogênese, sendo, portanto, fator essencial no mecanismo regenerativo.⁽¹¹⁹⁾ A literatura sugere que o próprio epitélio gengival é uma fonte rica de PDGF que pode ser utilizado para regeneração periodontal, e ainda que a expressão de receptores para essas proteínas é aumentada em áreas onde houve dano tecidual em decorrência da própria injúria sofrida pelo tecido.⁽¹²⁰⁾

A literatura a respeito do efeito do PDGF *in vitro* e em modelos animais é vasta, e nos mostra que, embora ainda não haja uma definição de concentração e carreador ideal (o que parece ser uma constante para todos os fatores de crescimento atualmente estudados), tal proteína estimula as células relacionadas à regeneração do aparato de suporte periodontal, fazendo que os tratamentos com base nesse tipo de terapêutica apresentem melhores resultados quando comparados aos tratamentos regenerativos tradicionais.^(111, 120)

Um estudo clínico randomizado e controlado, multicentro e de fase III (no qual um grande número de pacientes é tratado com a mesma técnica ou medicamento, no intuito de se confirmar sua efetividade, monitorar efeitos colaterais, comparar seu uso aos tratamentos tradicionalmente utilizados para a mesma finalidade, além de garantir a segurança da persistência de seu uso como alternativa terapêutica) avaliou o uso do rhPDGF associado ao β -Tri-Cálcio-Fosfato (β -TCP) no tratamento de defeito intraósseos com 4 ou mais milímetros de profundidade. Os resultados clínicos e radiográficos obtidos após 3 e 6 meses de estudo não demonstraram os mesmos benefícios citados na literatura nos estudos prévios, o que levantou dúvidas sobre a validade da terapia com PDGF no tratamentos em humanos.⁽¹²¹⁾

FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF)

A família dos IGF é constituída pelo IGF-I e II, que têm a capacidade de se ligar a três diferentes receptores, atuando como mediadores biológicos e com a possibilidade de interagir no ciclo de diferenciação das células do ligamento periodontal⁽¹²²⁻¹²⁴⁾ e também no metabolismo ósseo.⁽¹²⁵⁾

O IGF-I estimula *in vitro* a produção de matriz extracelular e a proliferação de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, de uma maneira dose e tempodependente, porém, sem afetar a adesão, migração e expressão de colágeno do tipo I por essas células.⁽¹²⁶⁾

A literatura atual sugere que o IGF, isoladamente, não é capaz de estimular as atividades celulares de maneira a interferir positivamente na regeneração tecidual⁽¹²⁷⁾, com efeitos limitados ou inexistentes.⁽¹¹¹⁾

Apesar disso, o IGF-I pode interagir de forma sinérgica com outros fatores de crescimento como o PDGF e o FGF, melhorando a regeneração dos tecidos periodontais de suporte em geral, em modelos animais⁽¹²⁸⁾ e **humanos**⁽¹¹³⁾, indicando que mais atenção deve ser dada em pesquisas futuras às interações entre o IGF e os demais fatores de crescimento.⁽¹²⁷⁾

FATOR DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO β (TGF- β)

O TGF pode ser encontrado em alta concentração nas plaquetas e no próprio tecido ósseo, regulando diferenciação e replicação celular, inibindo ou estimulando o crescimento celular, modulando inclusive a ação de outros fatores como o PDGF e FGF. O TGF- β estimula a síntese de matriz extracelular pelas células do ligamento periodontal, aliado ao fato de que a expressão dos receptores para tal molécula se mostra aumentada nos tecidos periodontais regenerados, sugerindo que essa substância interage na dinâmica da regeneração periodontal. Apesar disso, os estudos sobre a relevância clínica do uso desse fator de crescimento ainda são contraditórios, e esse questionamento não respondido nos estudo em modelos animais faz que mais estudo sejam necessários para se avaliar o valor dessa terapia.⁽¹¹¹⁾

PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)

Como citado antes, as BMPs são didaticamente denominadas fatores de diferenciação, devido ao tipo de ação que têm sobre os tecidos.⁽¹¹⁴⁾ A principal diferença entre as BMPs e os fatores de crescimento já citados é que as primeiras atuam principalmente nas células precursoras, ainda indiferenciadas, guiando tais células para a região do defeito, forçando sua multiplicação e diferenciação, e, por consequência, levando à formação de tecido. Os demais fatores de crescimento atuam preferencialmente em células já diferenciadas, agindo principalmente por meio do aumento da secreção de matriz por essas células.^(128, 130)

As BMPs são proteínas secretadas por células e capazes de agir de maneira parácrina ou autócrina sobre as células do tecido ósseo, estabelecendo organização em um âmbito celular e tecidual e induzindo a formação de matriz óssea, sendo, dessa forma, considerada como molécula osteoindutora.⁽¹¹⁴⁾ Os estudos com BMPs começaram na década de 1960, tendo por base o uso de matriz óssea desmineralizada em defeitos criados em músculo de ratos, o que levou à descoberta de que havia alguma substância na matriz óssea que levava à formação ectópica de osso. A essa substância deu-se o nome de BMP.⁽¹³¹⁻¹³³⁾

Atualmente, a família das BMPs conta com mais de 20 proteínas, e seu uso em engenharia tecidual tem sido extensivamente estudado, inclusive para a regeneração de tecidos periodontais.⁽¹³⁴⁾ Dentre elas, a única que já apresenta liberação para uso clínico comercial é a BMP-2, mais especificamente seu recombinante humano (rhBMP-2), embora sua indicação em humanos ainda não seja para o tratamento de defeitos periodontais, e sim para preenchimento de alvéolos de extração e cirurgias de levantamento do assoalho do seio maxilar.^(22, 23, 135)

Ainda que as propriedades osteoindutivas do recombinante humano da BMP-2 sejam reduzidas em comparação à BMP purificada e extraída de ossos⁽¹³⁶⁾, seu uso se disseminou devido ao fato de a primeira ser livre de contaminação por outras proteínas, eliminando-se o risco de transmissão de doenças ou infecções nos enxertos, mantendo-se a atividade osteoindutora.^(137, 138)

Estudos em animais demonstrando o uso de rhBMP-2 em defeitos periodontais críticos testaram uma gama diversa de carreadores, doses e intervalos de cicatrização, chegando sempre a resultados com significativa formação óssea, muitas vezes relacionada ao tipo de biomaterial carreador e à criação de um espaço físico para que a regeneração ocorresse. Nesses estudos, a BMP-2 também induziu a formação de cimento sobre as raízes dentárias, porém, sem a existência de um novo ligamento periodontal com fibras bem orientadas.⁽¹³⁹⁻¹⁴³⁾ Na maioria dos casos, um tecido fibroso ocupou o espaço do ligamento periodontal, e em períodos mais tardios, é possível observar anquilose ou ainda casos de reabsorção óssea nas regiões em contato com esse tecido.⁽¹³⁹⁻¹⁴³⁾ Apesar disso, também existem alguns estudos que mostram que a regeneração óssea e periodontal (cimento) não foi acompanhada por anquilose ou reabsorção tecidual.^(144, 145)

TERAPÊUTICA PERIODONTAL REGENERATIVA

De uma maneira geral, o que se pode dizer é que os estudos pré-clínicos mostram que a rhBMP-2 induz a formação de osso em defeitos críticos no esqueleto maxilofacial, e que o osso neoformado apresenta as mesmas características do osso “residente” da região regenerada.⁽¹⁴⁶⁾ Apesar disso, ainda são necessários estudos clínicos que validem o uso dessa técnica em humanos, principalmente em relação à possibilidade de regeneração de tecido periodontal de proteção por completo, incluindo osso, cimento e ligamento periodontal, bem como da definição precisa dos carreadores e dosagens mais eficientes para tal finalidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os defeitos periodontais são morfologicamente caracterizados como defeitos supra ou infraósseos, defeitos de furca ou recessões gengivais, ou ainda a combinação destes. Na literatura, a configuração do defeito se apresenta como um importante fator que pode predizer os resultados das técnicas regenerativas usadas em cada caso. A anatomia da região, associada à quantidade e distribuição dos componentes vasculares e celulares ao redor do defeito tratado, também exerce fator crucial nas terapias de regeneração periodontal. Tais componentes, sejam eles de origem periodontal ou alveolar, mostram-se reduzidos em defeitos ósseos de uma ou duas paredes, em defeitos de furca extensos (classes II e III) e nos defeitos supra-alveolares, interferindo diretamente nos resultados da terapia regenerativa empregada.^(111, 147) Isso faz desses defeitos um desafio constante para os periodontistas.

Nas últimas décadas, estudos que associam técnicas cirúrgicas regenerativas, biomateriais e fatores de crescimento colocaram à disposição dos periodontistas novas possibilidades de tratamento, associadas sempre ao restabelecimento completo da anatomia e função perdida em decorrência do colapso dos tecidos periodontais. Discutir quais dessas técnicas (e se) vão se transformar no padrão-ouro

do tratamento periodontal é tarefa delicada e ambiciosa, tendo em vista que a cada dia novas possibilidades surgem, muitas vezes sem o embasamento técnico científico que se espera antes de transformar um tratamento experimental em modelo clínico. Do nosso ponto de vista, uma prova de que ainda existem muitas dúvidas sobre o real benefício dos tratamentos regenerativos aqui discutidos é a ausência de conclusões sobre eles na literatura no sentido de se sugerir uma opção definitiva quando queremos restabelecer o tecido periodontal perdido.

Consultando a literatura de uma maneira sistematizada em busca por tais respostas, vemos que os fatores que mais interferem no surgimento de uma solução definitiva são – além, é claro, da complexidade do problema a ser resolvido – a variabilidade de critérios e técnicas empregadas nos estudos, impedindo que os clínicos façam comparações diretas entre técnicas e resultados. De modo geral, os estudos levam a crer que a combinação de substitutos ósseos com técnicas de regeneração tecidual beneficia, ainda que de forma discreta, a quantidade de tecido ósseo em áreas antes defeituosas. Mas, de uma maneira mais ampla, é difícil obter resultados generalizados sobre demais parâmetros que devam ser considerados quando pensamos em regeneração periodontal.⁽¹⁴⁸⁾

Como citado no início deste capítulo, o propósito da engenharia tecidual é estabelecer novos protocolos clínicos para o tratamento e regeneração dos defeitos antes considerados de prognóstico duvidoso, fazendo dessa ciência o objetivo final e ideal dos tratamentos clínicos.⁽¹⁹⁾ Falta, ainda, trazermos esses conceitos para a clínica, avaliando criteriosamente os resultados desses novos protocolos para a saúde de nossos pacientes, de maneira que os novos paradigmas do tratamento das doenças periodontais estejam pautados não apenas na aplicação de tecnologia de ponta em nossos tratamentos, mas também na reflexão de que devemos sempre manter nosso foco clínico em resultados mais completos e duradouros para nossos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Reynolds M. A.; Aichelmann-Reidy M. E.; Branch-Mays G. L. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am* 2010; 54:55-71.
- Apatzidou D. A.; Kinane D. F. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent Clin North Am* 2010; 54:1-12.
- Nievers M. G.; Schaapveld R. Q.; Sonnenberg A. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* 1999; 18:5-17.
- Shimono M.; Ishikawa T.; Enokiyama Y.; Muramatsu T.; Matsuzaka K.; Inoue T. et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. *J Electron Microsc* (Tokyo) 2003; 52:627-39.
- Kay S. A.; Wisner-Lynch L.; Marxer M.; Lynch S. E. Guided bone regeneration: integration of a resorbable membrane and a bone graft material. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1997; 9:185-94.
- Misch C. E.; Dietrich F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993; 2:158-67.
- Woolfson D. N. Building fibrous biomaterials from alpha-helical and collagen-like coiled-coil peptides. *Biopolymers* 2010; 94:118-27.
- Woolfson D. N.; Mahmoud Z. N. More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chem Soc Rev* 2010; 39:3464-79.
- Langer R.; Vacanti J. P. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-6.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006; 3:589-601.
- Williams K. R.; Blayney A. W. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials* 1987; 8:254-8.
- Service R. F. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000; 289:1498-500.
- Boss J. H.; Shajrawi I.; Aunnullah J.; Mendes D. G. The relativity of biocompatibility: A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci* 1995; 31:203-9.
- Aaboe M.; Pinholt E. M.; Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33:312-8.
- Giannoudis P. V.; Dinopoulos H.; Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3:520-7.
- Cornell C. N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:591-8.
- Urist M. R. Physiologic basis of bone-graft surgery, with special reference to the theory of induction. *Clin Orthop* 1953; 1:207-16.
- Urist M. R.; McLean F. C. The local physiology of bone repair with particular reference to the process of new bone formation by induction. *Am J Surg* 1953; 85:444-9.
- Urist M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:899-9.
- Urist M. R. The classic: a morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467:3068-70.
- Urist M. R.; Strates B. S. The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467:3051-62.
- Triplet R. G.; Nevins M.; Marx R. E.; Spagnoli D. B.; Oates T. W.; Moy P. K. et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1947-60.
- Boyne P. J.; Lilly L. C.; Marx R. E.; Moy P. K.; Nevins M.; Spagnoli D. B. et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhB. M. P-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:1693-707.
- Marx R. E.; Snyder R. M.; Kline S. N. Cellular survival of human marrow during placement of marrow-cancellous bone grafts. *J Oral Surg* 1979; 37:712-8.
- Bartee B. K. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part I: rationale and materials selection. *J Oral Implantol* 2001; 27:187-93.
- Marx R. E. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007; 19:455-66, v.
- Carvalho P. S.; Mariano R. C.; Okamoto T. Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B. diethylamide associated with gelfoam: a histological study. *Braz Dent J* 1997; 8:3-8.
- Carvalho V. A.; Tosello D. O.; Salgado M. A.; Gomes M. F. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:679-86.
- Tormala P.; Pohjonen T.; Rokkanen P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Inst Mech Eng [H]* 1998; 212:101-11.
- Mellonig J. T.; Nevins M.; Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998; 18:129-37.
- Mellonig J. T.; Nevins M.; Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part I. Material alone. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998; 18:139-49.
- Amrani S.; Anastassov G. E.; Montazem A. H. Mandibular ramus/coronoid process grafts in maxillofacial reconstructive surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 68:641-6.
- Clayman L. Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: review of the literature and presentation of 8 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:674-82.
- Crespi R.; Vinci R.; Cappare P.; Gherlone E.; Romanos G. E. Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:527-32.
- Vaccaro A. R.; Chiba K.; Heller J. G.; Patel T.; Thalgott J. S.; Truumees E. et al. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J* 2002; 2:206-15.
- Vaccaro A. R. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002; 25:s571-8.
- Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983:28-42.
- Chen N. T.; Glowacki J.; Buckley L. P.; Hong H. Z.; Kim W. K.; Yaremchuk M. J. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93:714-22.
- Park J. S.; Choi S. H.; Moon I. S.; Cho K. S.; Chai J. K.; Kim C. K. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 2003; 30:443-53.
- Ilkovits J. L.; Burdick J. A. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng* 2007; 13:2369-85.
- Webb J. C.; Spencer R. F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89:851-7.
- Pereira-Junior O. C.; Rahal S. C.; Iamaguti P.; Felisbino S. L.; Pavan P. T.; Vulcano L. C. Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *J Biomater Appl* 2007; 21:283-97.
- Guarino V.; Causa F.; Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev Med Devices* 2007; 4:405-18.
- Burger E. L.; Patel V. Calcium phosphates as bone graft extenders. *Orthopedics* 2007; 30:939-42.
- Boyce T.; Edwards J.; Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:571-81.
- Sandhu H. S.; Grewal H. S.; Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:685-98.
- Lamerigts N. M.; Buma P.; Huiskes R.; Schreurs W.; Gardeniers J.; Slooff T. J. Incorporation of morsellized bone graft under controlled loading conditions. A new animal model in the goat. *Biomaterials* 2000; 21:741-7.
- Schreurs B. W.; Arts J. J.; Verdonchot N.; Buma P.; Slooff T. J.; Gardeniers J. W. Femoral component revision with use of impaction bone-grafting and a cemented polished stem. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88:259-74.
- Schreurs B. W.; Buma P.; Huiskes R.; Slaughter J. L.; Slooff T. J. Morsellized allografts for fixation of the hip prosthesis femoral component. A mechanical and histological study in the goat. *Acta Orthop Scand* 1994; 65:267-75.
- Schreurs B. W.; Slooff T. J.; Buma P.; Verdonchot N. Basic science of bone impaction grafting. *Instr Course Lect* 2001; 50:211-20.
- Van der Donk S.; Buma P.; Slooff T. J.; Gardeniers J. W.; Schreurs B. W. Incorporation of morsellized bone grafts: a study of 24 acetabular biopsy specimens. *Clin Orthop Relat Res* 2002:131-41.
- Van der Donk S.; Weemink T.; Buma P.; Aspenberg P.; Slooff T. J.; Schreurs B. W. Rinsing morsellized allografts improves bone and tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res* 2003:302-10.
- Wang H. L.; Tsao Y. P. Mineralized bone allograft-plug socket augmentation: rationale and technique. *Implant Dent* 2007; 16:33-41.
- Longoni S.; Sartori M.; Apruzzese D.; Baldoni M. Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:478-83.
- Faiella R. A. Is human bone allograft safe for the management of alveolar defects? A primer for patient consent. *J Mass Dent Soc* 2007; 56:18-20.
- Maiorana C.; Sigurta D.; Mirandola A.; Garlini G.; Santoro F. Sinus elevation with alloplasts or xenogenic materials and implants: an up-to-4-year clinical and radiologic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:426-32.
- Keith J. D.; Jr.; Petrongaro P.; Leonetti J. A.; Elwell C. W.; Zeren K. J.; Caputo C. et al. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26:321-7.
- Froum S. J.; Tarnow D. P.; Wallace S. S.; Jalbout Z.; Cho S. C.; Rohrer M. D. et al. The use of a mineralized allograft for sinus augmentation: an interim histological case report from a prospective clinical study. *Compend Contin Educ Dent* 2005; 26:259-68.
- Minichetti J. C.; D'Amore J. C.; Hong A. Y.; Cleveland D. B. Human histologic analysis of mineralized bone allograft (Puros) placement before implant surgery. *J Oral Implantol* 2004; 30:74-82.
- Keith J. D.; Jr. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24:11-7.
- American Association of Tissue Banks. 16th annual meeting. August 24-26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993; 33:610-21.
- Kakaiya R. M.; Jackson B. Regional programs for surgical bone banking. *Clin Orthop Relat Res* 1990:290-4.
- Pietrzak W. S.; Woodell-May J. The composition of human cortical allograft bone derived from FDA/AAIB-screened donors. *J Craniofac Surg* 2005; 16:579-85.
- Tomford W. W.; Ploetz J. E.; Mankin H. J. Bone allografts of femoral heads: procurement and storage. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68:534-7.
- Troyer D. Biorepository standards and protocols for collecting, processing, and storing human tissues. *Methods Mol Biol* 2008; 441:193-220.
- Joyce M. J. American association of tissue banks: a historical reflection upon entering the 21st century. *Cell Tissue Bank* 2000; 1:5-8.

67. Joyce M. J. Safety and FDA regulations for musculoskeletal allografts: perspective of an orthopaedic surgeon. *Clin Orthop Relat Res* 2005;22-30.

68. Von Versen R. Musculoskeletal tissue banking in Europe – regulations and quality assurance. *Ann Chir Gynaecol* 1999; 88:215-20.

69. Carr C. R.; Hyatt G. W. Clinical evaluation of freeze-dried bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1955; 37-A:549-66.

70. Sanan A.; Haines S. J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997; 40:588-603.

71. Bonfiglio M.; Jeter W. S. Immunological responses to bone. *Clin Orthop Relat Res* 1972; 87:19-27.

72. Palmer S. H.; Gibbons C. L.; Athanasou N. A. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:333-5.

73. Aspenberg P; Thoren K. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. An experiment in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1990; 61:546-8.

74. Burwell R. G. Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograf-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. *J Bone Joint Surg Br* 1966; 48:532-66.

75. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:543-52.

76. Eppley B. L.; Pietrzak W. S.; Blanton M. W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005; 16:981-9.

77. Mankin H. J.; Hornicek F. J.; Raskin K. A. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2005;210-6.

78. Mankin H. J.; Hornicek F. J. Treatment of giant cell tumors with allograft transplants: a 30-year study. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 439:144-50.

79. Mankin H. J.; Gebhardt M. C.; Tomford W. W. The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:275-89.

80. Mankin H. J.; Gebhardt M. C.; Jennings L. C.; Springfield D. S.; Tomford W. W. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;86-97.

81. Mankin H. J.; Doppelt S.; Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983;69-86.

82. Bassett C. A.; Campbell J. B.; Girado J. M.; Rossi J. P.; Seymour R. J. Application of monomolecular filter tubes in bridging gaps in peripheral nerves and for prevention of neuroma formation: a preliminary report. *J Neurosurg* 1956; 13:635-7.

83. Campbell J. B.; Bassett C. A. The surgical application of monomolecular filters (Millipore) to bridge gaps in peripheral nerves and to prevent neuroma formation. *Surg Forum* 1957; 7:570-4.

84. Hurley L. A.; Stinchfield F. E.; Bassett A. L.; Lyon W. H. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 1959; 41-A:1243-54.

85. Caffesse R. G.; BA S. M.; Duff B.; Morrison E. C.; Merrill D.; Becker W. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. *J Periodontol* 1990; 61:510-4.

86. Caffesse R. G.; Dominguez L. E.; Nasjleti C. E.; Castelli W. A.; Morrison E. C.; Smith B. A. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J Periodontol* 1990; 61:45-50.

87. Gottlow J.; Nyman S.; Lindhe J.; Karring T.; Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986; 13:604-16.

88. Stahl S. S.; Froum S.; Tarnow D. Human histologic responses to guided tissue regenerative techniques in intrabony lesions. Case reports on 9 sites. *J Clin Periodontol* 1990; 17:191-8.

89. Stahl S. S.; Froum S. J. Healing of human suprabony lesions treated with guided tissue regeneration and coronally anchored flaps. Case reports. *J Clin Periodontol* 1991; 18:69-74.

90. Valone D.; Dyer B.; Caffesse P. G. Guided tissue regeneration in the treatment of human periodontal disease. *J Gt Houst Dent Soc* 1990; 61:6-10.

91. Dahlin C.; Sennerby L.; Lekholm U.; Linde A.; Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4:19-25.

92. Isidor F.; Attstrom R.; Karring T. Regeneration of alveolar bone following surgical and non-surgical periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 1985; 12:687-96.

93. Isidor F.; Karring T.; Nyman S.; Lindhe J. New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 1985; 12:728-35.

94. Karring T.; Isidor F.; Nyman S.; Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 1985; 12:51-60.

95. Melcher A. H.; McCulloch C. A.; Cheong T.; Nemeth E.; Shiga A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodontal Res* 1987; 22:246-7.

96. Nyman S.; Karring T.; Lindhe J.; Plantens S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980; 7:394-401.

97. Gottlow J.; Nyman S.; Karring T.; Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984; 11:494-503.

98. Villar C. C.; Cochran D. L. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*; 54:73-92.

99. Chambrone L.; Sukekava F.; Araujo M. G.; Pustiglioni F. E.; Chambrone L. A.; Lima L. A. Root-coverage procedures for the treatment of localized recession-type defects: a Cochrane systematic review. *J Periodontol*; 81:452-78.

100. Murphy K. G.; Gursolley J. C. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8:266-302.

101. Claffey N.; Clarke E.; Polyzois I.; Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35:316-32.

102. Esposito M.; Grusovin M. G.; Felice P.; Karatzopoulos G.; Worthington H. V.; Coulthard P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants – a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2009; 2:167-84.

103. Miguel F. B.; Cardoso A. K.; Barbosa A. A.; Jr.; Marcantonio E. J.; Gois G.; Rosa F. P. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 78:334-9.

104. Rosa F. P.; Lia R. C.; de Souza K. O.; Gois G.; Marcantonio E. J. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials* 2003; 24:207-12.

105. Gois G.; Marcantonio E. J.; Jr.; Marcantonio R. A.; Lia R. C.; Cancian D. C.; de Carvalho W. M. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* 1999; 20:27-34.

106. Cirelli J. A.; Marcantonio E. J.; Jr.; Adriana R.; Marcantonio C.; Lia R. C.; Gois G. et al. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials* 1997; 18:1227-34.

107. Lekholm U.; Becker W.; Dahlin C.; Becker B.; Donath K.; Morrison E. The role of early versus late removal of GTAM membranes on bone formation at oral implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4:121-9.

108. Schenk R. K.; Buser D.; Hardwick W. R.; Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9:13-29.

109. Phillips R. W.; Jendresen M. D.; Klooster J.; McNeil C.; Preston J. D.; Schallhorn R. G. Report of the Committee on Scientific Investigation of the American Academy of Restorative Dentistry. *J Prosthet Dent* 1990; 64:74-110.

110. Jones J. K.; Triplett R. G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:237-9.

111. Lee J.; Stavropoulos A.; Susin C.; Wikesjo U. M. Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors. *Dent Clin North Am*; 54:93-111.

112. Ripamonti U.; Reddi A. H. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8:154-63.

113. Howell T. H.; Fiorelli J. P.; Paquette D. W.; Offenbacher S.; Giannobile W. V.; Lynch S. E. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997; 68:1186-93.

114. Granjeiro J. M.; Oliveira R. C.; Bustos-Valenzuela J. C.; Sogayar M. C.; Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:1463-73.

115. Sato Y.; Kikuchi M.; Ohata N.; Tamura M.; Kuboki Y. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *J Periodontol* 2004; 75:243-8.

116. Eppley B. L.; Connolly D. T.; Winkelmann T.; Sadove A. M.; Heuvelman D.; Feder J. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88:1-11.

117. Rossa C.; Jr.; Marcantonio E. J.; Cirelli J. A.; Marcantonio R. A.; Spolidorio L. C.; Fogli J. C. Regeneration of Class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF-6) associated with GTR: descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000; 71:775-84.

118. Kitamura M.; Nakashima K.; Kowashi Y.; Fujii T.; Shimauchi H.; Sasano T. et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2/randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One* 2008; 3:e2611.

119. Hollinger J. O.; Hart C. E.; Hirsch S. N.; Lynch S.; Friedlander G. E. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90 Suppl 1:48-54.

120. Pinheiro M. L.; Feres-Filho E. J.; Graves D. T.; Takiya C. M.; Elias M. I.; Elias P. P. et al. Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; 74:323-8.

121. Nevins M.; Giannobile W. V.; McGuire M. K.; Kao R. T.; Mellonig J. T.; Hinrichs J. E. et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol* 2005; 76:2205-15.

122. Clemmons D. R.; Moses A. C.; McKay M. J.; Sommer A.; Rosen D. M.; Ruckle J. The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for in vivo biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1518-24.

123. Han X.; Amar S. Role of insulin-like growth factor-1 signaling in dental fibroblast apoptosis. *J Periodontol* 2003; 74:1176-82.

124. Han X.; Amar S. IGF-I signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82:454-9.

125. Giannobile W. V.; Whitson S. W.; Lynch S. E. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J Dent Res* 1997; 76:1569-78.

126. Palotto D. B.; Coletta R. D.; Graner E.; Joly J. C.; de Lima A. F. The influence of enamel matrix derivative associated with insulin-like growth factor-I on periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 2004; 75:498-504.

127. Dereka X. E.; Markopoulou C. E.; Vrotsos I. A. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 2006; 24:260-7.

128. Giannobile W. V.; Hernandez R. A.; Finkelman R. D.; Ryan S.; Kirtsy C. P.; D'Andrea M. et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I; individually and in combination, on periodontal regeneration in Macaca fascicularis. *J Periodontol Res* 1996; 31:301-12.

129. Wikesjo U. M.; Sigurdsson T. J.; Lee M. B.; Tatakis D. N.; Selvig K. A. Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy. *J Calif Dent Assoc* 1995; 23:30-5.

130. Sigurdsson T. J.; Tatakis D. N.; Lee M. B.; Wikesjo U. M. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995; 66:511-21.

131. Urist M. R.; Grant T. T.; Lindholm T. S.; Mirra J. M.; Hirano H.; Finerman G. A. Induction of new-bone formation in the host bed by human bone-tumor transplants in athymic nude mice. *J Bone Joint Surg Am* 1979; 61:1207-16.

AVANÇOS EM PERIODONTIA E IMPLANTODONTIA

paradigmas e desafios

132. Urist M. R.; Mikulski A. J. A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 162:48-53.
133. Urist M. R.; Mikulski A.; Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:1828-32.
134. Reddi A. H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1:S1-6.
135. Fiorellini J. P.; Howell T. H.; Cochran D.; Malmquist J.; Lilly L. C.; Spagnoli D. et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* 2005; 76:605-13.
136. Bessho K.; Kusumoto K.; Fujimura K.; Konishi Y.; Ogawa Y.; Tani Y. et al. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999; 37:2-5.
137. Toriumi D. M.; East C. A.; Rosen D. M.; Chu G.; Liu C. C.; Larrabee W. F. Bone-inducing implants in head and neck surgery: an experimental study. *Laryngoscope* 1991; 101:395-404.
138. Toriumi D. M.; Kotler H. S.; Luxenberg D. P.; Holtrop M. E.; Wang E. A. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117:1101-12.
139. Wikesjö U. M.; Lim W. H.; Thomson R. C.; Cook A. D.; Wozney J. M.; Hardwick W. R. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioabsorbable space-providing macroporous membrane with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Periodontol* 2003; 74:635-47.
140. Wikesjö U. M.; Lim W. H.; Razi S. S.; Sigurdsson T. J.; Lee M. B.; Tatakis D. N. et al. Periodontal repair in dogs: a bioabsorbable calcium carbonate coral implant enhances space provision for alveolar bone regeneration in conjunction with guided tissue regeneration. *J Periodontol* 2003; 74:957-64.
141. Wikesjö U. M.; Xiropaidis A. V.; Thomson R. C.; Cook A. D.; Selvig K. A.; Hardwick W. R. Periodontal repair in dogs: space-providing ap. T. F. E. devices increase rhB. M. P-2/A. C. S-induced bone formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30:715-25.
142. Wikesjö U. M.; Xiropaidis A. V.; Thomson R. C.; Cook A. D.; Selvig K. A.; Hardwick W. R. Periodontal repair in dogs: rhB. M. P-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 2003; 30:705-14.
143. Wikesjö U. M.; Lim W. H.; Thomson R. C.; Hardwick W. R. Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for GT. R? *J Clin Periodontol* 2003; 30:655-64.
144. Blumenthal N. M.; Koh-Kunst G.; Alves M. E.; Miranda D.; Sorensen R. G.; Wozney J. M. et al. Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon. *J Periodontol* 2002; 73:1494-506.
145. Kinoshita A.; Oda S.; Takahashi K.; Yokota S.; Ishikawa I. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol* 1997; 68:103-9.
146. Wikesjö U. M.; Qahash M.; Huang Y. H.; Xiropaidis A.; Polimeni G.; Susin C. Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications: biological observations – clinical implications. *Orthod Craniofac Res* 2009; 12:263-70.
147. Kim C. S.; Choi S. H.; Chai J. K.; Cho K. S.; Moon I. S.; Wikesjö U. M. et al. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs: influence of the number of bone walls on healing response. *J Periodontol* 2004; 75:229-35.
148. Needleman I. G.; Worthington H. V.; Giedrys-Leeper E.; Tucker R. J. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD001724.

Tecido ósseo homólogo para utilização em Odontologia

Allogenic bone tissue used in dental practice: Literature review

Rubens Spin-Neto*
Ricardo Andrés Landazuri del Barrio*
Felipe Leite Coletti**
Luiz Guilherme Freitas de Paula***
Elcio Marcantonio****
Elcio Marcantonio Jr*****

RESUMO

O uso de enxertos ósseos provenientes de bancos de tecidos, também conhecidos como enxertos homólogos, tem aumentado nos últimos anos, embora a maioria dos usuários deste biomaterial ainda apresente dúvidas em relação à sua captação e processamento. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão da literatura sobre a utilização do osso homólogo em Odontologia, bem como sobre a legislação envolvida na utilização deste material. Estudos sobre fatores como métodos de seleção dos doadores, riscos de infecção cruzada e técnicas de processamento deste biomaterial ainda são escassos, porém, fundamentais para que, aliados àqueles sobre a aplicabilidade do mesmo, embasem a sua utilização clínica.

Unitermos - Enxerto ósseo; Transplante homólogo; Métodos; Procedimentos.

ABSTRACT

The use of bone grafts from bone tissue banks, also known as bone allografts, has increased in the last years, although most of its users still have concerns on resources and processing protocols. The objective of this paper was to make a literature review about the use of bone allografts in Dentistry, and also about the legal considerations regarding this biomaterial. Studies regarding the donor selection, the cross-infection risks and processing protocols of this biomaterial are still rare but essential, and allied to those regarding its clinical application, can base its use.

Key Words - Bone graft; Homologous transplantation; Method; Procedures.

* Doutorandos e mestres em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp.

** Doutorando em Implantodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp; Mestre em Implantodontia – Fundação Educacional de Barretos – FEB.

*** Mestrando em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp.

**** Professor titular aposentado do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Disciplina de Cirurgia Bucomaxilofacial – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp.

***** Professor titular do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Disciplina de Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp.

Introdução

O uso de tecido ósseo proveniente de bancos de tecidos, conhecido como enxerto homólogo, tem aumentado nos últimos anos. A indicação deste biomaterial ocorre na ausência de osso autólogo para captação, ou em casos onde o paciente apresenta resistência frente à necessidade de manipulação de um segundo leito cirúrgico para captação do enxerto; atividade esta frequentemente associada a problemas na fase pós-operatória, tais como edema, dor e infecção¹.

Vantagens como facilidade de obtenção na quantidade desejada, redução do tempo cirúrgico e a não necessidade da manipulação de uma segunda área cirúrgica tornam o osso homólogo uma alternativa interessante nas cirurgias de reconstrução óssea prévias a reabilitação com implantes osseointegráveis². Acredita-se que este biomaterial atue como uma plataforma para a neoformação óssea, agindo preferencialmente como osteocondutor³.

A Portaria GM/MS nº 1686, de 20/09/2002, acrescida pela RDC nº 220, de 27/12/2006, aprovou as normas para funcionamento e cadastramento de bancos de tecidos musculoesqueléticos; nas instituições autorizadas para tal fim, a seleção dos doadores, o processo de captação, armazenamento e estocagem do enxerto homólogo devem ser realizados de forma criteriosa, seguindo não só a legislação brasileira, mas também as normas da Associação Americana de Banco de Tecidos (AATB), para diminuir antigenicidade, transmissão de doenças, infecções e outras complicações que possam advir desse procedimento⁴.

Embora, teoricamente, exista o risco de transmissão de doenças através deste biomaterial é reduzido pelo processamento (o material é obtido fresco, congelado a baixíssima temperatura e tem todo o seu conteúdo celular removido). Porém, este mesmo processamento causa deterioração das suas propriedades biológicas, por diminuir a resistência mecânica e eliminar toda a fase celular do tecido⁵.

Frequentemente, o osso homólogo é tratado como um material receptor universal, já que o potencial imunológico do tecido processado é reduzido através dos processos de remoção celular e congelamento. No entanto, estudos em animais da mesma espécie demonstraram que em alguns casos o transplante de tecido ósseo pode deflagrar resposta imunológica, embora sua relevância clínica seja desconhecida⁶.

Neste trabalho, o objetivo foi fazer uma revisão da literatura sobre a utilização de osso homólogo em Odontologia, bem como sobre a legislação envolvida na aplicação deste material, baseando-se em artigos publicados e indexados no Medline, publicados nos últimos 25 anos, e também em leis, decretos, portarias e resoluções publicados pelo Ministério da Saúde e pela Anvisa – Agência de Vigilância Sanitária – e que regulamentam o funcionamento dos bancos de tecido musculoesqueléticos brasileiros.

Revisão da Literatura

Tecido ósseo homólogo

O tecido ósseo autólogo é considerado o padrão ouro para enxertia e é largamente empregado quando da necessidade de aumento do volume ósseo, visto que é o mais completo em termos de propriedades como osteogênese, osteocondução e osteoindução. Além disso, por ter origem no mesmo indivíduo que irá receber o enxerto, a aceitação do procedimento pelo organismo torna-se facilitada, sem risco de rejeição. Contudo, inconvenientes desta técnica podem ser descritos como a necessidade de internação em alguns casos, necessidade de criação de uma segunda área cirúrgica, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante⁷. Nem sempre a obtenção de quantidade e qualidade adequadas de osso autólogo é simples e os inconvenientes citados anteriormente podem desencorajar o paciente à realização do procedimento.

Dentre os biomateriais que têm sido propostos na literatura atual, há o osso homólogo, obtido de bancos de tecido musculoesquelético. O uso deste biomaterial aumentou 15 vezes durante a última década⁸ e isso fez com que o número de fornecedores capacitados também aumentasse; hoje é possível obter fragmentos ósseos personalizados, moldados especificamente para o defeito que deseja-se preencher⁹.

Há relatos na literatura do uso de osso homólogo desde o início dos anos 1800, porém, foi o estabelecimento dos BTME's, na década de 1950, que formalizou seu uso¹⁰. Anteriormente ao desenvolvimento das tecnologias de processamento de tecidos, o osso homólogo era utilizado fresco, obtido do cadáver ou de um doador vivo, embora nestes casos, riscos de contaminação ou rejeição devido à reações imunológicas fossem aumentados. Atualmente, os componentes celulares dos homoenxertos são removidos ou mortos, na tentativa de prevenir a ocorrência de rejeição¹¹.

O uso de enxertos homólogos tornou-se comum em cirurgias ortopédicas, onde havia a demanda de blocos ósseos extensos, utilizados no tratamento de lesões tibiais, femorais, colunares, entre outras¹²⁻¹³. Mais recentemente, o uso em Odontologia também se tornou corriqueiro, principalmente nas cirurgias prévias à colocação de implantes, buscando aumento de espessura e altura ósseas¹⁴.

Normalmente, blocos ósseos congelados obtidos da região femoral ou patelar são utilizados, sendo que a sua obtenção deve ser feita em bancos de tecido com segurança garantida, preferencialmente daqueles que seguem os protocolos de obtenção e processamento preconizados e certificados pela Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB), ou ainda da Associação Europeia de Transplantes Musculoesqueléticos (EAMST)¹⁵.

O processamento deste tecido, conforme proposto pela AATB, inclui o debridamento físico para remoção do teci-

Seguindo a implantação de um enxerto homólogo, há um número enorme de processos que ocorrem, causando sua remodelação. Isso é iniciado por uma reação inflamatória, a partir da qual as regiões necróticas do tecido implantado começam a ser reabsorvidas, criando espaços que permitam sua invasão por vasos sanguíneos, e a chegada das células responsáveis pelo metabolismo ósseo (osteoclastos e osteoblastos), atuando na remodelação gradativa da região.

do mole e redução da carga celular, lavagem ultrassônica para remover o restante das células e de sangue, lavagem com etanol para desnaturar as proteínas celulares e causar a inativação de qualquer vírus que possa existir, lavagem com antibióticos para matar bactérias, corte do tecido ósseo na geometria específica e esterilização, feita por irradiação gama ou exposição ao óxido de etileno, prévios ao seu congelamento e liberação do lote de tecido para distribuição⁶. Esse processamento faz com que a capacidade osseointegradora deste tipo de enxerto seja muito pequena, ou até mesmo, inexistente¹⁶.

Seguindo a implantação de um enxerto homólogo, há um número enorme de processos que ocorrem, causando sua remodelação. Isso é iniciado por uma reação inflamatória, a partir da qual as regiões necróticas do tecido implantado começam a ser reabsorvidas, criando espaços que permitam sua invasão por vasos sanguíneos, e a chegada das células responsáveis pelo metabolismo ósseo (osteoclastos e osteoblastos), atuando na remodelação gradativa da região. Os osteoclastos irão degradar a matriz óssea homóloga enxertada, enquanto que os osteoblastos irão secretar osso novo, sempre de uma maneira progressiva, em um termo conhecido atualmente como *creeping substitution*. Finalmente, o enxerto homólogo é completamente remodelado e substituído por osso novo, porém, o tempo exato que essa finalização levará para ocorrer é indeterminado, visto que é dependente de vários fatores, como o tipo do enxerto utilizado (cortical ou esponjoso), a vascularização do leito receptor e a quantidade de material necrótico a ser remodelado¹⁷.

Comparado ao enxerto autólogo, o enxerto homólogo apresenta capacidade de revascularização e remodelação consideravelmente mais lentas e a união entre o leito receptor e o enxerto é obtida de forma consistente, porém, não uniforme¹⁸. A maior demanda de tempo necessário para remodelação, a necessidade de respeito absoluto aos protocolos de captação e processamento, para que não ocorra contaminação, e o fator psicológico de se utilizar

um material obtido de cadáveres são as desvantagens mais enfocadas na literatura⁸.

Na literatura observa-se que as taxas de sucesso, entendido pela correta incorporação dos enxertos homólogos, varia entre 60 e 90%, avaliados de maneira clínica e radiográfica, porém, na área Ortopédica^{2,19-22}. Já na área Odontológica, onde o termo sucesso vai muito além da mera incorporação do enxerto, envolvendo a capacidade do enxerto osseointegrar implantes e suportar cargas mastigatórias ao longo dos anos, estudos citando taxas de sucesso são ainda inexistentes.

Legislação

Tão importante quanto o conhecimento sobre as bases biológicas do uso dos enxertos homólogos é o entendimento da situação legal que embasa a utilização dos mesmos, de tal modo que o cirurgião-dentista que opte por este tipo de biomaterial possa ter todo o respaldo legal quando de sua utilização.

A Lei federal nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, dispôs sobre "remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano (de cadáveres ou doadores vivos) para fins de transplante e tratamento, além de dar outras providências legais sobre o tema"²³. Tal Lei foi alterada pela Lei nº 10.211, de 23 de março de 2001, no que diz respeito à expressão de vontade pela doação de órgãos e tecidos, que só poderá ser feita na "dependência da autorização do cônjuge ou parente, maior de idade, obedecida a linha sucessória, reta ou colateral, até o segundo grau inclusive, firmado em documento subscrito por duas testemunhas presentes à verificação da morte"²⁴.

Nestas Leis²³⁻²⁵ ficou estabelecido que transplantes ou enxertos só serão feitos com o consentimento expresso do paciente receptor, após aconselhamento sobre as características e os riscos envolvidos no procedimento. Nos casos em que o receptor for juridicamente incapaz ou que não esteja apto a manifestar sua vontade, o consentimento poderá ser feito por um de seus pais ou responsáveis legais. Tais Leis

também estabeleceram ainda que é proibido a veiculação, através de qualquer meio de comunicação, de publicidade dos estabelecimentos autorizados a realizar transplantes e enxertos, relativa a estas atividades ou de apelo público no sentido da doação de tecidos ou órgãos.

Ainda de acordo com a Legislação, é obrigatório, para todos os estabelecimentos de saúde, informar às centrais de notificação, captação e distribuição de órgãos da unidade federada onde ocorrer o diagnóstico de morte encefálica feito em pacientes por eles atendidos²³⁻²⁴. Além disso, "remover tecidos, órgãos ou partes do corpo de pessoa ou cadáver, em desacordo com as disposições destas Leis configura crime, com pena de reclusão, de dois a seis anos, e multa, de 100 a 360 dias multa, se o crime é cometido mediante pagamento ou promessa de recompensa ou por outro motivo torpe; ou ainda com pena de reclusão por até dez anos, se o crime é praticado em pessoa viva, e resulta para o ofendido incapacidade para as ocupações habituais por mais de 30 dias, perigo de vida, debilidade permanente de membro, sentido ou função, aceleração de parto, incapacidade para o trabalho, enfermidade incurável, perda ou inutilização de membro, sentido ou função, deformidade permanente ou aborto, e finalmente com pena de reclusão de até 14 anos se o crime é praticado em pessoa viva e resulta morte"²³⁻²⁴.

Para o cirurgião-dentista é fator relevante e que pode ser considerado como crime, com pena de reclusão que pode chegar a até 20 anos, o "ato de comprar ou vender tecidos, órgãos ou partes do corpo humano ou promover, intermediar, facilitar ou auferir qualquer vantagem com a transação e ainda realizar transplante ou enxerto utilizando tecidos, órgãos ou partes do corpo humano de que se tem ciência de terem sido obtidos em desacordo com os dispositivos legais", ou ainda "recolher, transportar, guardar ou distribuir partes do corpo humano de que se tem ciência de terem sido obtidas em desacordo com os dispositivos legais"²³⁻²⁴. Com isto em vista, fica claro que é essencial ao cirurgião-dentista possuir conhecimento sobre a legalidade do banco de tecidos do qual o mesmo solicita estes tecidos e, principalmente, se o mesmo está de acordo com as normas vigentes.

No intuito de se preservar a dignidade do doador e para não causar constrangimentos à sua família, também é considerado crime passível de detenção "deixar de recompor cadáver, devolvendo-lhe aspecto condigno, para sepultamento ou deixar de entregar ou retardar sua entrega aos familiares ou interessados"²³⁻²⁴. Nesses casos, cabe à equipe médica que faz a captação dos órgãos e tecidos realizar tal reconstrução.

Em relação especificamente à doação de tecidos musculoesqueléticos, a Portaria GM/MS nº 1.686, de 20 de setembro de 2002, acrescida pela RDC/Anvisa nº 220, de 27/12/2006, aprova as normas para autorização de funcionamento e cadastramento de bancos de tecidos músculo-esqueléticos²⁵⁻²⁶.

Nesta Portaria, frente à necessidade de regulamentar a "captação, proteção ao doador e ao receptor, coleta, processamento, estocagem, distribuição e transplante de tecidos musculoesqueléticos e na tentativa de coibir que tais práticas sejam realizadas, em todo o território nacional, seja por pessoas físicas ou jurídicas, em caráter eventual ou permanente, por serviços que estejam em desacordo com o ordenamento estabelecido" foram estabelecidas as normas para autorização de funcionamento e cadastramento de BTME's, sendo que todos devem ser vinculados ao SUS²⁵.

Pela Portaria, entende-se por BTME "o serviço que, com instalações físicas, equipamentos, recursos humanos e técnicas adequadas, seja destinado à captação, triagem clínica, laboratorial e sorológica, coleta, identificação, processamento, estocagem e distribuição de tecido musculoesquelético de procedência humana para fins terapêuticos ou de pesquisa"²⁵.

Tais bancos poderão funcionar independentemente do fato de serem privados ou vinculados ao SUS, com licença de funcionamento emitida pela Anvisa, além da autorização dada pelo Sistema Nacional de Transplantes, em conformi-

No intuito de se preservar a dignidade do doador e para não causar constrangimentos à sua família, também é considerado crime passível de detenção "deixar de recompor cadáver, devolvendo-lhe aspecto condigno, para sepultamento ou deixar de entregar ou retardar sua entrega aos familiares ou interessados"²³⁻²⁴. Nesses casos, cabe à equipe médica que faz a captação dos órgãos e tecidos realizar tal reconstrução.

dade com as Normas internacionais que regem a utilização desse tipo de tecido. Para que seja autorizado a funcionar, além do cumprimento das Normas aprovadas nas Leis, o Banco deve comprovar que estará aberto e em funcionamento para atendimento das demandas nas 24 horas do dia, todos os dias, e assegurar o controle e garantia de qualidade dos procedimentos, equipamentos, reagentes e correlatos²⁵.

A garantia da qualidade dos tecidos musculoesqueléticos distribuídos é de responsabilidade do BTME e a responsabilidade médica e técnica final de sua utilização é do cirurgião transplantador ou profissional. O Banco de Tecidos pode fornecer tecidos por ele processados para realização de transplantes, "tanto em caráter privado como pelo SUS, somente a serviços que estejam devidamente autorizados pelo Sistema Nacional de Transplantes a realizar seu implante"²⁵. No caso dos cirurgiões-dentistas, estarão autorizados a utilizar esse biomaterial os especialistas em Periodontia, Cirurgia Bucomaxilofacial ou Implantodontia que solicitarem seu cadastro junto a Central Nacional de Captação e Doação de Órgãos (CNCDO). O cadastro pode ser feito pelo envio *on-line* da documentação, que envolve a cópia da inscrição no Conselho da categoria (CRO) e cópia do título de especialista devidamente registrado, sem qualquer custo adicional²⁵.

Na legislação ficou estabelecido que é responsabilidade do banco de tecidos avaliar clínica e laboratorialmente todos os tecidos musculoesqueléticos, até mesmo radiograficamente, "... a fim de identificar possíveis contraindicações a seu emprego e garantir, por meio de protocolos, a padronização relativa aos processos e ao controle da qualidade dos tecidos musculoesqueléticos humanos que estejam sob sua responsabilidade, mantendo registros dos processos de controle e garantia de qualidade dos procedimentos, equipamentos, reagentes e correlatos, além de disponibilizar para a equipe responsável pelo transplante, todas as informações necessárias a respeito do tecido a ser utilizado, bem como sobre seu doador, mantendo em sigilo a sua identidade"²⁵.

De acordo com a legislação, o banco deverá ainda manter arquivo próprio com todos os dados de identificação e técnicos sobre os receptores e tecidos - captados, processados, armazenados e distribuídos - por no mínimo 25 anos e enviar relatórios mensais a CNCDO sobre as atividades de captação e distribuição de tecidos do Banco, garantindo assim sua rastreabilidade. O BTME deve assegurar "... a formação e aperfeiçoamento de recursos humanos responsáveis por todas as etapas envolvidas no processo - captação, triagens clínica, laboratorial e sorológica, coleta, identificação, processamento, armazenamento e distribuição dos tecidos musculoesqueléticos -, estabelecendo programas de ensino, pesquisa e desenvolvimento tecnológico nas áreas de interesse de banco de tecidos e transplante de tecidos musculoesqueléticos"²⁵.

Desta forma, até novembro de 2009, alguns bancos de tecido brasileiros forneciam cursos de capacitação para profissionais, alunos dos cursos de Especialização, interessados na utilização deste material, mas que não poderiam ser cadastrados como autorizados a utilizá-lo, devido à falta do título de especialista. Feito este curso, o cirurgião-dentista ficava autorizado a solicitar tecidos apenas no banco que lhe ministrou o curso, vinculado ao que é chamado de "Projeto Piloto" pelos bancos que ministram tais cursos. Tão logo o cirurgião obtivesse o título de especialista, o mesmo poderia alterar seu cadastro junto à CNCDO e passaria a utilizar qualquer um dos bancos disponíveis. Essa situação foi modificada em 04/11/2009, quando a Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes optou por suspender a existência desses "Projetos Piloto" e fez com que haja necessidade de cadastramento dos profissionais junto à CNCDO de seu estado para que o mesmo esteja habilitado a captar biomaterial homólogo, sem que isso interfira na realização de cursos que informem e capacitem os profissionais que desejam usar esse recurso em sua prática clínica.

Atualmente, no Brasil existem seis BTME's com autorização de funcionamento, que podem ser procurados pelos cirurgiões-dentistas como fontes de material homólogo para enxertia. Quatro deles estão localizados na região sudeste do país, três no estado de São Paulo (Unioess Marília, Hospital das Clínicas das USP - São Paulo e Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo) e um no estado do Rio de Janeiro (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia - Into). Os outros dois bancos autorizados estão localizados na região Sul do país, um na cidade de Passo Fundo (RS), vinculado ao hospital São Vicente de Paulo e o outro na cidade de Curitiba (PR), vinculado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná.

Conclusão

Nesta revisão da literatura foram abordados pontos sobre a utilização do osso homólogo em Odontologia e sobre a legislação envolvida na utilização deste material. Mais estudos sobre os resultados clínico-odontológicos da aplicação deste biomaterial são necessários e fundamentais para, aliados ao conhecimento jurídico que embasa sua utilização, ratificar a sua utilização clínica.

Recebido em: nov/2009

Aprovado em: dez/2009

Endereço para correspondência:

Rubens Spin Neto

Rua Humaitá, 1.680

14801-903 - Araraquara - SP

Tel.: (16) 3301-6378

netorubens@yahoo.com.br

Referências bibliográficas

1. Misch CE. Implant dentistry. *Dent Today* 2002;21:62.
2. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983;69:86.
3. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990;14:243-8.
4. Friedlaender GE. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 1987;17-21.
5. Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank* 2000;1:105-9.
6. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:543-52.
7. de Carvalho PS, Mariano RC, Okamoto T. Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B diethylamide associated with gelfoam: a histological study. *Braz Dent J* 1997;8:3-8.
8. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999;30:571-81.
9. Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999;30:685-98.
10. Carr CR, Hyatt GW. Clinical evaluation of freeze-dried bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1955;37-A:549-66.
11. Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997;40:588-603.
12. Schreurs BW, Arts JJ, Verdonchot N, Buma P, Slooff TJ, Gardeniers JW. Femoral component revision with use of impaction bone-grafting and a cemented polished stem. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(Suppl 1, Pt 2):259-74.
13. van der Donk S, Weernink T, Buma P, Aspenberg P, Slooff TJ, Schreurs BW. Rinsing morselized allografts improves bone and tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res* 2003.p.302-10.
14. Longoni S, Sartori M, Apruzzese D, Baldoni M. Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:478-83.
15. American Association of Tissue Banks. 16th Annual meeting. August 24-26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993;33:610-21.
16. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005;16:981-9.
17. Aspenberg P, Thoren K. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. An experiment in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1990;61:546-8.
18. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:270-9.
19. Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2005;210-6.
20. Mankin HJ, Hornicek FJ. Treatment of giant cell tumors with allograft transplants: a 30-year study. *Clin Orthop Relat Res* 2005;439:144-50.
21. Mankin HJ, Gebhardt MC, Tomford WW. The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am* 1987;18:275-89.
22. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;86-97.
23. Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997.
24. Lei nº10.211, de 23 de março de 2001.
25. Portaria GM/MS nº 1.686, de 20 de setembro de 2002.
26. RDC/Anvisa nº 220, Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF; 2006.

Exploring CBCT-Based DICOM Files. A Systematic Review on the Properties of Images Used to Evaluate Maxillofacial Bone Grafts

Rubens Spin-Neto · Elcio Marcantonio Jr. ·
Erik Gottfredsen · Ann Wenzel

© Society for Imaging Informatics in Medicine 2011

Abstract Previous studies suggests that cone beam computerized tomography (CBCT) images could provide reliable information regarding the fate of bone grafts in the maxillofacial region, but no systematic information regarding the standardization of CBCT settings and properties is available, i.e., there is a lack of information on how the images were generated, exported, and analyzed when bone grafts were evaluated. The aim of this study was to (1) do a systematic review on which type of CBCT-based DICOM images have been used for the evaluation of the fate of bone grafts in humans and (2) use a software suggested in the literature to test DICOM-based data sets, exemplifying the effect of variation in selected parameters (windowing/contrast control, plane definition, slice thickness, and number of measured slices) on the final image characteristics. The results from review identified three publications that used CBCT to evaluate maxillofacial bone grafts in humans, and in which the methodology/results comprised at least one of the expected outcomes (image acquisition protocol, image reconstruction, and image generation information). The experimental shows how the influence of information that was missing in the retrieved papers, can influence the reproducibility and the validity of image measurements. Although the use of CBCT-based images for the evaluation of bone grafts in humans has

become more common, this does not reflect on a better standardization of the developed studies. Parameters regarding image acquisition and reconstruction, while important, are not addressed in the proper way in the literature, compromising the reproducibility and scientific impact of the studies.

Keywords CBCT · Bone graft · Windowing · Plane definition · Slice thickness

Introduction

Bone volume and bone quality are factors of particular interest in determining the optimal location for placing dental implants and for their prognosis over time [1]. The necessity for an adequate bone volume, providing sufficient ridge height and width for functional and esthetic implant therapy, made bone grafting a common and well-documented procedure in dental practice during the last decades [2].

The gold standard evaluation method used to characterize the fate of the grafted bone over time has been a histological evaluation of a sample of the graft, but in the literature also other methods have been developed for this purpose, mainly biomechanical, biomolecular, and non-invasive imaging methods [3–5].

Recent developments of cone beam computerized tomography (CBCT) have facilitated the evaluation of the grafted region. CBCT may be an efficient tool to evaluate bone remodeling compared to medical CT scanning since it has a relatively low acquisition time and patient dose, and the images are suitable for evaluation of treatment results at various post-operative periods in longitudinal studies [6, 7].

DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) has become the standard format protocol for

R. Spin-Neto · E. Marcantonio Jr.
Department of Periodontology, Araraquara Dental School,
UNESP—Univ. Estadual Paulista,
Araraquara, São Paulo, Brazil

R. Spin-Neto (✉) · E. Gottfredsen · A. Wenzel
Department of Oral Radiology, School of Dentistry,
Aarhus University,
Vennelyst Boulevard 9,
8000 Aarhus C, Denmark
e-mail: netorubens@yahoo.com.br

large image data sets such as CBCT-based data sets [8]. There is a wide range of software able to import DICOM files and export sections or images in other formats, which can later be used for specific measurements [9].

Although the literature suggests that CBCT images could provide reliable information regarding the fate of the bone graft [10, 11], systematic information regarding the protocols of the image-oriented software evaluating the grafts is not available. There seems to be no standardization regarding the CBCT settings, properties, and radiation dose. There is also a lack of information on how the images were generated, exported, and analyzed when bone grafts were evaluated in specific software. This may lead to inconsistencies that can compromise the scientific value of the generated images, and subsequently the outcome measures based on these [9].

For the evaluation of bone grafts, measurements of bone volume, height, width, and density have been used to conclude on the fate of the grafted bone [6, 12]. Studies have reported on successful bone healing based on bone density information retrieved from CBCT-based data [13], but density values can be questioned due to distortion of Hounsfield Units (HU) in CBCT imaging, i.e., scanned regions of the same density in the skull can have different gray scale values in the reconstructed CBCT data set [14].

Our objective was to (1) do a systematic review on which type of CBCT-based DICOM images have been used for the evaluation of the fate of bone grafts in humans, retrieving scientific evidence regarding the image acquisition, reconstruction, and generation parameters and (2) use a software suggested in the literature to test DICOM-based data sets, exemplifying the effect of variation in selected parameters (windowing/contrast control, plane definition, slice thickness, and number of measured slices) on the final image characteristics.

Material and Methods

The MEDLINE (PubMed) bibliographic database was searched from 1950 to October 2010 for reports on the use of cone beam CT images for the evaluation of bone grafts. The search strategy was limited to human studies in English language publications using the following combined terms in the search strategy: (cone beam CT OR cone beam tomography OR CBCT) AND (graft OR bone OR transplant OR augmentation).

The electronic search was supplemented with a “hand” search of *Journal of Periodontology*, *Clinical Oral Implants Research*, *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, *The Journal of Oral Implantology*, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *Journal of Clinical Periodontology*, and *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*.

Studies examining the fate of maxillofacial bone grafts based on CBCT-image evaluation qualified for inclusion. Data extraction included information regarding (1) image acquisition, (2) reconstruction, and (3) generation methods, including the software used to generate the evaluated images. All references were screened by one reviewer, and the accuracy of data extraction was verified separately by all authors.

Based on the information retrieved from the examined papers, software was chosen to be used in the DICOM image sets of test patients. Parameters regarding image reconstruction and generation were changed in order to test their interference in the final image used for clinical decision making. For that, DICOM image sets were acquired from bone-grafted patients, using an i-CAT Classic (Imaging Sciences International, USA), with a resolution of 96 dpi, 14-bits gray scale, and 0.25 mm voxel size, and set to 120 kVp, 5 mA, 20 s exposure time. Characteristics such as windowing (contrast control), plane definition, and number and thickness of measured sections were addressed, focusing on how the information, which was missing in the retrieved papers, can influence the reproducibility and the validity of measurements. The research protocol was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee.

Results

Review Search Results

The search strategy yielded 527 publications in MEDLINE (PubMed). “Hand” search did not reveal any additional papers. The initial screening of the articles was conducted using the abstracts and key words, but when these were unclear or unavailable, the full text was used.

Screening yielded 12 citations that potentially met the inclusion criteria, but nine papers were excluded for the following reasons: two papers regarded the possibility of using CBCT in the evaluation of bone surgery, including bone grafts, but without clinical results [15, 16]; one paper was in vitro [17]; one paper was based on the fate of the donor area and not the fate of the graft [18]; two papers were based on other techniques to achieve bone augmentation—membrane alone and split-crest technique [19, 20]; one paper did not aim at evaluating the outcome of CBCT [21]; and two papers regarded the use of CBCT in the planning of the implant to be inserted in the grafted area, but did not concern the graft itself [22, 23].

Three publications were identified that used CBCT to evaluate maxillofacial bone grafts in humans, and in which the methodology/results comprised at least one of the expected outcomes (image acquisition protocol, image

Table 1 Summary of sample characteristics of the included studies

Study	Sample characteristics				
	Number of patients	Age range (years)	Type of graft	Number of examinations	Period of examination
Hamada et al. 2005 [33]	13 (6 males/7 females)	8–38	Onlay (does not specify from where the blocks were retrieved)	1	Between 2 and 51 months post-surgery
Gapski et al. 2008 [32]	1 (female)	53	Inlay (bovine hydroxyapatite and bone allograft)	3	Baseline, immediate post-operative and 6-month control
Oberoi et al. 2009 [34]	21 (15 males/6 females)	7–13	Onlay (blocks retrieved from the iliac crest)	2	Baseline and a minimum of 12 months after surgery

reconstruction, and image generation information). The selected papers included one case report [24] and two prospective (consecutive cases) studies [25, 26].

Review Retrieved Results

Tables 1, 2, and 3 show the information retrieved from these studies.

The studies differed notably with respect to image acquisition, generation, and reconstruction. In total, the included papers reported the fate of the graft in 35 patients using CBCT as the evaluation method [24–26].

All patients had alveolar defects located in the maxilla, 34 of them in the anterior region (onlay bone grafts) and one in the posterior (sinus lift—“inlay” bone graft). In one study, autologous bone retrieved from the anterior iliac crest was used as grafting material [26], and one study used a mix of bovine hydroxyapatite and bone allograft [24]. The third study did not report the origin of the grafts [25].

Two studies had a baseline image to be compared with the final image [24, 26], and the only study with a fixed evaluation interval was the case report [24]. One study reported complete information regarding the image acquisition protocols (acquisition time, kilovoltage (kV), miliampere (mA), image resolution, and slice thickness) [25].

All studies were based on measurements made directly in the DICOM rendering software, but none of them reported information regarding the windowing (contrast control), which was used to visualize bone. Two studies displayed information on how the orientation plane for

generation of image sections was defined, and also how the sections were oriented, and how many sections were evaluated [25, 26].

The three studies used different software to reorient and render the DICOM files. One study was based on software that runs an exclusive file extension (ICATVision), i.e., the DICOM files were converted to another format before the images were accessed and measured [24]. The other two [25, 26] were based on DICOM manipulating software; only one of which is still available on the market (Amira, Visage Imaging Inc., USA). This piece of software was therefore chosen for the next phase of our study.

Experimental Results

Results from the experiment are based on the software Amira 5.3.1 (Visage Imaging, USA), used in an earlier version in one of the previous studies [26]. This software has been used for medical purposes since 1995. We used the most recent version, which was still available in the market when the paper was written (September 2010).

Windowing

None of the selected papers described this issue. The used software does not predefine specific values for different types of tissue, but allows the user to change the values, and therefore the view, to the image’s mapped values. We evaluated five values for the center level (L) and band width (W) of the displayed shades of gray, and these values

Table 2 Summary of the image acquisition protocols used in the included studies (nd = no data)

Study	Image acquisition protocol				
	Acquisition time	kV	mA	Voxel resolution	CBCT equipment
Hamada et al. 2005 [33]	20.48 s	80	10	0.117 mm	PSR 9000 (Asahi Roentgen Ind. Co. Ltd., Kyoto, Japan)
Gapski et al. 2008 [32]	nd	nd	nd	nd	i-CAT (Imaging Sciences International, Hatfield, USA)
Oberoi et al. 2009 [34]	nd	nd	nd	nd	MercuRay (Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan)

Table 3 Summary of the image reconstruction protocols used in the included studies (nd = no data)

Study	Image reconstruction protocol				Direct measurement/ exported image	Resolution	Windowing	Plane orientation definition	Measured slices	Slice thickness
	DICOM orientation software	Image rendering software	Image orientation	Not used						
Hamada et al. 2005 [33]	VIP station imaging (Cenax-Icon Inc., Fremont, USA)	Not used			Direct measurement	Images not exported	nd	Based on central panoramic curve of each subject, and subsequent sections based on that curve	7 (1 central, 3 buccal, and 3 palatal)	1.0 mm
Gapski et al. 2008 [32]	nd	ICATVision (Imaging Sciences International, Hatfield, USA)			Direct measurement	Images not exported	nd	nd	nd	nd
Oberoi et al. 2009 [34]	CB Works 2.01 (CyberMed Inc., Seoul, Korea)	Amira 3.1.1 (Visage Imaging, USA)			Direct measurement	Images not exported	nd	Five well-defined planes delimitating a ROI, in which the sections were analyzed	All from the ROI	0.4 mm

were based on what is suggested when evaluating i-CAT-based DICOM images ($W=2,272$ and $L=1,758$, which allows the maximum intensity projection visualization; $W=1,858$ and $L=1,131$, suggested for tooth visualization; $W=2,829$ and $L=1,803$ suggested for panoramic image visualization; $W=3,086$ and $L=667$ suggested for the visualization of cross-section images of the jaws; and finally $W=3,285$ and $L=2,061$ suggested for cephalometric evaluation).

The subjective differences between the images generated using the five settings for the windowing can be seen in Fig. 1. It is clear that depending on the W and L , the limits of the bone are more or less conspicuous, and therefore measurements may vary.

Plane Definition

The selected software does not allow the creation of individualized planes for image segmentation. This made it more difficult to find the correct sections that would intercept the evaluated region perpendicularly. Therefore, it is complex to obtain standardized transversal slices of the region of interest (ROI), which will become a problem when measuring graft height and width.

In Fig. 2, the same ROI is shown in different planes. The ROI is from the posterior maxilla, and the correct transverse section of the area to be grafted can be seen in the coronal plane (a), while the sagittal plane (c) shows an image, which is useless for height and width assessment. In the anterior region, the transverse sections (perpendicular to the evaluated region) are found on the sagittal plane as shown in Fig. 1. The ideal software should facilitate the creation of individualized new planes allowing the generation of exact bucco-palatal transverse images of the graft.

Section Thickness

In the selected software, the module that allows image segmentation and windowing does not allow changes in section thickness. The voxel resolution is therefore the thickness of the displayed section. Although restrictive, image standardization can be achieved in this way. Another module in the software (Multi-planar Viewer) allows section thickness manipulation, but is not connected to windowing adjustment. To exemplify how section thickness modification can influence the characteristics of the final image, Fig. 3 illustrates images of the same region generated using different section thickness values, ranging from 0.25 to 10 mm.

The subjective evaluation of these images reveals that the thickness of the sections affects the appearance of the reconstructed image, e.g., superimposition of anatomic structures and bone grafts/screws is seen in thick sections.

Fig. 1 Test anterior grafted region displayed using different values for the center level (L) and band width (W) of shades of gray displayed. The figures on the top left represent W/L



This “anatomical noise” can disturb images interpretation. This is illustrated in Fig. 4, with a thick section (30 mm) providing a final image in which it is impossible to delineate grafts placed at different sites.

Number of Sections

We generated a set of images of a grafted region at three different time periods: baseline (before grafting procedure), immediately after surgery, and 6 months post-operatively. The images were acquired using a windowing definition able to show transverse (sagittal) sections ($W=3,086$ and $L=667$), the section thickness was 0.25 mm and the interval between the sections was 1.0 mm, until a complete mapping of the grafted block was fulfilled.

Figure 5 shows that different results are obtained if only a central image of the graft is used to measure height and width compared to the information shown on sections 4D and 4E with their adjacent sections, such as 4A/4B and 4G/4H. When comparing the same grafted region at different time periods, the ideal should be to obtain a full profile of the bone area, allowing the visualization of the final “volume” of the area (complete width and height profile).

Discussion

The success rate associated with dental implant treatment is directly related to the bone volume and quality surrounding the implants, and therefore special attention has been given in the literature to bone-grafting procedures and how to evaluate the fate of the grafts [1–5, 27, 28]. Previous literature has agreed on histology as the “gold standard” evaluation method to evaluate bone graft remod-

eling, but an alternative method could be non-invasive imaging [4–12, 16, 18, 20, 37, 38].

A new imaging method for dentistry, CBCT has enabled 3D display of bone structures, which facilitates the assessment of boundaries of bone in areas selected for implant placement [29, 30]. The possibility of 3D manipulation and segmentation of the generated images has increased the value of this method. The parameters can be varied in order to attain images of the region(s) of interest, ranging from section thickness to the mapping of scalar values stored with the image that will be shown to the user (windowing, or contrast control) [29, 31].

Data transfer between workstations connected to a CBCT scanner follows the DICOM standard protocol [8, 31]. DICOM packages include information regarding patient information, image acquisition, and the list of images that correspond to axial sections to form 3D images, allied to a “map” of how the images must be oriented to generate the final images [7]. The CBCT manufacturers provide software to generate DICOM files of the exams, but there is also a wide range of software able to import DICOM files, work on them, and export sections of images in other formats [7, 31], and those images can later be used for various measurements [9]. A major problem is, however, that the selection of parameters related to image generation and manipulation in CBCT imaging, including the selection of software, cross-sectional slice thickness, inter-slice interval, windowing (contrast control), and resolution, seems to have been performed almost arbitrarily [29].

The intention of our review was to recapitulate how human bone grafts have been evaluated in studies using CBCT-based DICOM data sets and illustrate the deficiencies associated with the lack of standardization. In the

Fig. 2 Test posterior grafted region displayed in different planes. **a** Coronal, **b** axial, and **c** sagittal

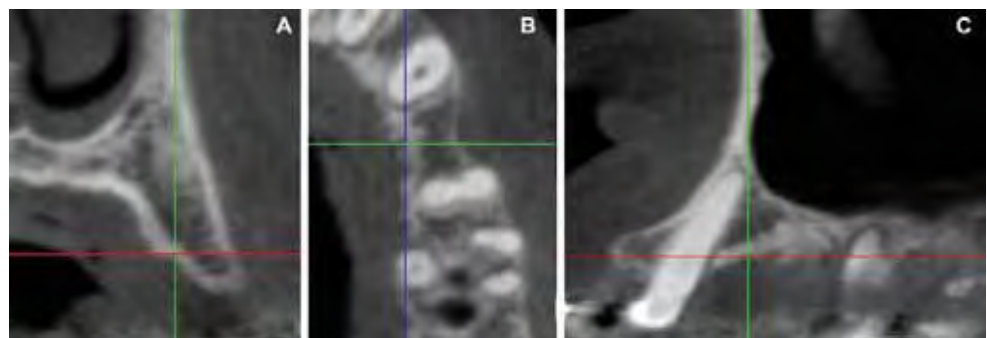
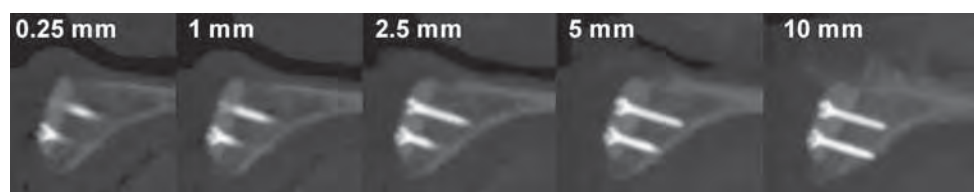


Fig. 3 Test anterior grafted region displayed using different values for section thickness (the figure on the *top left*)



systematic review, three publications were identified that used a CBCT technique to evaluate maxillofacial bone grafts in humans, together with at least one of the outcomes under review (image acquisition protocol, image reconstruction, and generation information) [24–26]. Included papers reported the outcomes of 35 maxillary grafted patients. The way images were acquired, generated, and reconstructed differed notably in these studies, and only one study provided complete information for image acquisition (time, kV, mA, and resolution) [25]. This information is extremely relevant in order to compare studies in the literature since these parameters can directly influence the characteristics of the final images [32]. The imaging protocol should concern population dose and image quality. The estimation of fatal cancer risk arising from oral and maxillofacial CBCT imaging has increased from 23% to 224% following new recommendations for calculating effective dose [33], and radiation dose is directly connected to the acquisition time, along with other factors such as FOV, mA, and kV [34]. It is important to emphasize that the “ALARA” principle should always be applied, thus the protocol (i.e., radiation dose) must be tailored to each case. The majority of the screened studies did not provide complete information regarding these variables. However, standardization over time is essential, since after windowing and leveling adjustments technique artifacts and noise may be minimized by software manipulation [34].

Pertaining to image quality, the literature still lacks evidence since no studies seem to have been conducted on

the relationship between dose and quality for CBCT. Studies on medical CT scanning are not comparable with CBCT since the resolution of the CBCT devices used in dentistry is higher, with small voxel sizes and also with a different signal-to-noise-pixel size correlation, derived from quantum statistics [33]. The structural details of a CBCT-based image are directly related to the voxel size, and depending on the purpose of the images, this may play a decisive role [35]. No information regarding the effects of different voxel sizes on the evaluation of bone grafts was found in the literature.

All selected papers concluded on results from measurements made directly in the image rendering software or in the DICOM orientation software; however, they were poor in presenting how the images were generated. The first point to address is the contrast control of the displayed image, also known as “windowing”. For DICOM images, visualization is based on a threshold filter, which assigns a binary value, either transparent or visible, to each voxel based on its gray level value [7]. For most DICOM orientation software, the user is able to define the critical value that splits the voxels into visible and invisible, or, in other words, the windowing of the image. This result in a rendered image is composed of all visible voxels. As shown by our test images, different windowing values provide different final images when different values for the center level (L) and band width (W) of shades of gray are used. This may influence linear and volumetric measurements.

Cortical bone, bone trabeculae, and intertrabecular tissue have varying densities, and in traditional medical CT these different densities can be interpreted using HU, providing a quantitative assessment of bone density as measured by its ability to attenuate an X-ray beam. However, density differences present a challenge when examining CBCT images. The displayed grey levels in CBCT systems are arbitrary and do not allow for the assessment of bone quality as performed with HU in medical CT [36]. In CBCT, image grey shades range between black and white, and the displayed shades can be arbitrarily limited to a large or small window within a contrast control scale. The windowing can be raised or lowered depending upon the absorption value of the material of interest, but at the same point the examiner must be able to decide which window level and width will most accurately represent the anatomic truth of a tissue under examination [37]. Without a concise



Fig. 4 Test anterior grafted region displayed using a section thickness of 30 mm. It is impossible to delineate the two bone graft blocks present in the image, and the superimposition of the screws and anatomic structures impedes assessment of the grafts

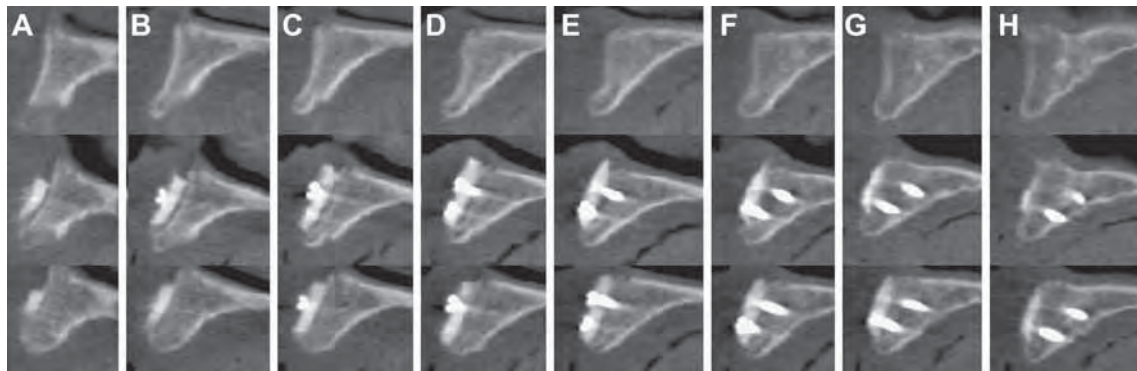


Fig. 5 Test anterior grafted region displayed using a slice thickness of 0.25 mm, generated each 1.0 mm in the ROI. Each row represents a different evaluation time of the same site: *top row* baseline (before

grafting procedure), *center row* immediately after the surgery, and *lower row* 6 months post-operatively. The images from **a** to **h** represent 0.25-mm-thick slices, made with a 1-mm interval

designation of the windowing that was used to evaluate a patient's image, it is impossible to reproduce the measurements and also to compare results between studies. Future studies should render the diagnostic accuracy of measurements in images where windowing varied.

The orientation plane for generation of the sections before measuring a grafted bone is another important issue. The DICOM data set can be accessed in different manners, and the operator can visualize it by going through a determined stack of sections. The 3D image can be reformatted and 2D images generated based on the 3D data set, allowing the operator to scroll through the 2D images in any plane or direction, and also in different depths, depending on section thickness. The generated sections will completely depend on the orientation planes. Knowing how the patient's head is oriented and in which direction the slices will be generated is a “sine qua non”. To facilitate image comparison over time, there are ways to superimpose CBCT data sets obtained from the same region, assuring that the images are generated from the same position. Reliable and accurate landmark-based superimposition techniques for evaluating changes over time have not been established yet, but there is focus on the issue [38]. In our review, the included papers aimed only at the anatomic guidelines to access a determined ROI and offered no information about recreating the same ROI in different images. Without this information a study cannot be reproduced, and the scientific value of papers that do not address this parameter can be contested since without the plane definition, the same ROI can be shown in diverse forms, many of them creating “contaminated” images of the area to be measured. In some cases, image signal-to-noise ratio may dictate the selection of section thickness; the thicker the sections the higher the signal-to-noise ratio in the images.

We also addressed the cross-sectional section thickness and the inter-section interval (the distance between adjacent cross-sectional images), directly connected to the number of

evaluated sections from each grafted site. Some clinicians believe that thinner, more closely approximated cross-sectional sections provide more accurate information since they are more prone to display important diagnostic features of a disease or condition [29], while thicker sections might show the superimposition of other structures, disturbing the evaluation of the ROI. It may also be possible to affirm that the more sections, the more precise the data extracted from the data set since the appearance of the reconstructed images (as reflected by differences in bone linear measurements) will be closer to the anatomical reality [29].

From our results, it is clear that software used for bone graft measurements in CBCT image sections must allow user control of the addressed parameters (windowing, plane orientation, slice thickness, and inter-slice interval). It must be a demand that authors specify the setting of these parameters, including the image acquisition protocol, image reconstruction, and image generation information, in order to allow reproduction and comparability among studies.

Conclusion

The parameters for image acquisition and reconstruction were not addressed in enough detail in the studies selected for this review, compromising their value. Based on our experiment, it can be concluded that CBCT images differ depending on windowing settings, plane definition, and number and thickness of sections, likely to influence measurement outcomes. We suggest that software to be used for bone measurements in CBCT images must include the possibility for controlling these variables, and that future studies describe in detail the used settings.

Acknowledgments This study was financed by the Brazilian agencies Fapesp (2008/09207-9), CAPES and CNPq.

References

- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 106:527–551, 1998
- Buser D, Dula K, Hess D, et al: Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 19:151–163, 2000
- Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 371:10–27, 2000
- Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW: Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 16:981–989, 2005
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: Bone substitutes: an update. *Injury* 36(Suppl 3):20–27, 2005
- Ehrhart N, Kraft S, Conover D, Rosier RN, Schwarz EM: Quantification of massive allograft healing with dynamic contrast enhanced-MRI and cone beam-CT: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 466:1897–1904, 2008
- Grauer D, Cevidanis LS, Proffit WR: Working with DICOM craniofacial images. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136:460–470, 2009
- Peck D: Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM): a practical introduction and survival guide. *J Nucl Med* 50:1384, 2009
- De Vos W, Casselman J, Swennen GR: Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: a systematic review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38:609–625, 2009
- Honma K, Kobayashi T, Nakajima T, Hayasi T: Computed tomographic evaluation of bone formation after secondary bone grafting of alveolar clefts. *J Oral Maxillofac Surg* 57:1209–1213, 1999
- Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM: A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* 30:157–161, 2001
- Verdugo F, Simonian K, Smith McDonald R, Nowzari H: Quantitation of mandibular ramus volume as a source of bone grafting. *Clin Implant Dent Relat Res* 11(Suppl 1):e32–37, 2009
- Lai RF, Zou H, Kong WD, Lin W: Applied anatomic site study of palatal anchorage implants using cone beam computed tomography. *International Journal of Oral Science* 2:98–104, 2010
- Swennen GR, Schutyser F: Three-dimensional cephalometry: spiral multi-slice vs cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130:410–416, 2006
- Cevidanis LH, et al: Three-dimensional surgical simulation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 138:361–371, 2010
- Ganz SD: Bone grafting assessment: focus on the anterior and posterior maxilla utilizing advanced 3-D imaging technologies. *Dent Implantol Update* 20:41–48, 2009
- Fatemitabar SA, Nikgoo A: Multichannel computed tomography versus cone-beam computed tomography: linear accuracy of in vitro measurements of the maxilla for implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25:499–505, 2010
- Verdugo F, Simonian K, D'Addona A, Ponton J, Nowzari H: Human bone repair after mandibular symphysis block harvesting: a clinical and tomographic study. *J Periodontol* 81:702–709, 2010
- Block MS, Haggerty CJ: Interpositional osteotomy for posterior mandible ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 67:31–39, 2009
- Takane M, et al: Clinical application of cone beam computed tomography for ideal absorbable membrane placement in interproximal bone defects. *J Oral Sci* 52:63–69, 2010
- Blake FA, Blessmann M, Pohlenz P, Heiland M: A new imaging modality for intraoperative evaluation of sinus floor augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37:183–185, 2008
- Heiland M, et al: Navigated implantation after microsurgical bone transfer using intraoperatively acquired cone-beam computed tomography data sets. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37:70–75, 2008
- Lopes N, Oliveira DM, Vajgel A, Pita I, Bezerra T, Vasconcellos RJ: A new approach for reconstruction of a severely atrophic mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 67:2455–2459, 2009
- Gapski R, et al: Histological, histomorphometric, and radiographic evaluation of a sinus augmentation with a new bone allograft: a clinical case report. *Implant Dent* 17:430–438, 2008
- Hamada Y, et al: Application of limited cone beam computed tomography to clinical assessment of alveolar bone grafting: a preliminary report. *Cleft Palate Craniofac J* 42:128–137, 2005
- Obero S, Chigurupati R, Gill P, Hoffman WY, Vargervik K: Volumetric assessment of secondary alveolar bone grafting using cone beam computed tomography. *Cleft Palate Craniofac J* 46:503–511, 2009
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 106:721–764, 1998
- Goldberg VM, Stevenson S: Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 225:7–16, 1987
- Chadwick JW, Lam EW: The effects of slice thickness and interslice interval on reconstructed cone beam computed tomographic images. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110:e37–42, 2010
- de Oliveira MG, Morais LE, Silva DN, de Oliveira HW, Heitz C, Gaiao L: Is 3D-CT reformation using free software applicable to diagnosis of bone changes in mandibular condyles? *J Appl Oral Sci* 17:166–169, 2009
- Gibaud B: The quest for standards in medical imaging. *Eur J Radiol*, 2010. doi:10.1016/j.ejrad.2010.05.003
- van Vlijmen OJ, Rangel FA, Berge SJ, et al: Measurements on 3D models of human skulls derived from two different cone beam CT scanners. *Clin Oral Investig*, 2010. doi:10.1007/s00784-010-0440-8
- Ludlow JB, Ivanovic M: Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106:106–114, 2008
- Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL, Howerton WB: Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dentomaxillofac Radiol* 35:219–226, 2006
- Yeni YN, Christopherson GT, Dong XN, Kim DG, Fyhrie DP: Effect of microcomputed tomography voxel size on the finite element model accuracy for human cancellous bone. *J Biomech Eng* 127:1–8, 2005
- Mah P, Reeves TE, McDavid WD: Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol* 39:323–335, 2010
- Schlueter B, Kim KB, Oliver D, Sortiropoulos G: Cone beam computed tomography 3D reconstruction of the mandibular condyle. *Angle Orthod* 78:880–888, 2008
- Lagravere MO, Major PW, Carey J: Sensitivity analysis for plane orientation in three-dimensional cephalometric analysis based on superimposition of serial cone beam computed tomography images. *Dentomaxillofac Radiol* 39:400–408, 2010

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar, em humanos, e comparativamente ao enxerto ósseo autólogo, a incorporação do enxerto ósseo homólogo obtido de bancos de tecidos músculo-esqueléticos, e sua capacidade de osseointegrar implantes de titânio, de maneira tomográfica, histológica e histomorfométrica, além de fazer uma avaliação imunológica sistêmica, buscando fatores que indiquem a ocorrência de resposta imune contra esses enxertos, seguindo sua implantação.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo piloto

4.1.1 Amostra

Neste estudo de casos clínicos consecutivos foram avaliadas biópsias obtidas de 12 pacientes, edêntulos parciais ou totais, de ambos os sexos, e com idade variando entre os 22 e 65 anos, atendidos nos Cursos de Especialização em Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), que buscavam reabilitação oral por meio de implantes osseointegráveis, porém apresentavam defeitos ósseos maxilo-faciais que impossibilitaram a instalação imediata desses implantes, necessitando, portanto, de procedimentos de enxertia óssea.

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CEP-FO/CAR) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (CONEP-MS) e aprovado sob o protocolo número 36/08 (*Anexo 01*). Os pacientes confirmaram sua aceitação em participar do estudo, mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo CEP-FO/CAR (*Anexo 02*).

O critério de inclusão de pacientes utilizado na pesquisa foi a necessidade de realização de enxerto ósseo previamente a realização dos implantes osseointegráveis (avaliado através de exame clínico). Os critérios de exclusão foram presença de doenças sistêmicas que

reconhecidamente atrapalhassem a incorporação de enxertos e a osseointegração de implantes (como o Diabetes Mellitus e a osteoporose), fumo, etilismo, e uso crônico de medicamentos.

Os 12 pacientes foram divididos em dois grupos, sendo que 6 pacientes receberam enxertos ósseos autólogos, e os outros 6 receberam enxertos ósseos homólogos, obtidos junto ao banco de tecidos músculo-esqueléticos da UniOss (Marília, Brasil), banco esse reconhecido e de funcionamento autorizado pela ANVISA. A alocação dos pacientes em cada um dos grupos não foi randômica. O osso autólogo é tido como padrão-ouro, e só foram tratados com osso homólogo pacientes que não possuíam osso autólogo em quantidade suficiente para enxertia ou aqueles pacientes que apresentavam grande resistência em relação a abertura de uma segunda área cirúrgica para remoção de seu próprio osso.

4.1.2 Procedimentos cirúrgicos

Para realização dos enxertos ósseos, após a anti-sepsia extra e intra-oral do campo operatório, foi realizado o bloqueio anestésico da região correspondente à inervação da área ser enxertada, e nos casos de enxertia autóloga, também da área doadora, no caso a linha oblíqua externa da mandíbula. O procedimento para retirada e instalação dos enxertos seguiu o protocolo clássico já descrito na literatura²⁷. Resumidamente, o procedimento foi iniciado com uma incisão sobre o rebordo, na região edêntula, seguida de incisões relaxantes. Foi

deslocado um retalho mucoperiostal que expôs o leito receptor, dando plena visualização do defeito ósseo a ser reparado. Incisões sob o perióstio do retalho foram realizadas a fim de diminuir a tensão tecidual e, conseqüentemente permitir o recobrimento do enxerto ósseo que seria instalado. Nos casos tratados com osso autólogo, a área doadora foi então abordada, com a exposição do leito ósseo e seu preparo, sob irrigação abundante, com o uso de fresas cilíndricas #700 e #701, e de delicados cinzéis, para remoção do bloco ósseo, que foi então trabalhado para permitir sua fixação ao leito com parafuso de titânio de 1,5 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil). Bordas irregulares que pudessem lacerar o retalho e conseqüentemente expor o enxerto foram removidas com brocas esféricas e sob irrigação constante, e as sobras ósseas obtidas durante o remodelamento dos blocos foram adaptadas ao redor dos blocos. Uma membrana reabsorvível de colágeno bovino (Genius-Baumer®, Mogi Mirim, Brasil) foi utilizada no recobrimento dos enxertos, no intuito de impedir a colonização de fibroblastos nessa área visto que o perióstio, encarregado dessa função, encontrava-se desorganizado, devido ao deslocamento do retalho. A primeira fase cirúrgica foi finalizada com o reposicionamento do retalho sobre a área receptora e sutura simples interrompida, usando fio não reabsorvível (Nylon 4-0, Ethicon, São José dos Campos, Brasil). A área doadora também foi suturada com sutura simples interrompida, usando fio não reabsorvível (Seda 4-0, Ethicon, São José dos Campos, Brasil).

No grupo tratado com osso homólogo, blocos de tecido ósseo corticais, obtido do banco de tecidos UNIOSS (Marília, Brasil), foram utilizados como biomaterial para enxertia, sendo que após retirados da embalagem, foram colocados por 5 minutos em solução salina estéril para reidratação e retorno à temperatura ambiente. Um dos casos clínicos tratados é exposto como exemplo na Figura 1.

Os pacientes receberam orientações pós-operatórias incluindo a prescrição de medicação sistêmica constituída por antibiótico (Amoxicilina 500mg, 3 vezes ao dia, durante 7 dias), antiinflamatório (Nimesulida 100mg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias) e analgésico (Paracetamol 750mg, 4 vezes ao dia, se houver dor) e medicação tópica constituída por enxágüe de digluconato de clorexidina a 0,12%. A sutura foi removida após 14 dias e a região operada permaneceu sem influência de carga direta durante toda a fase de cicatrização óssea. Para os pacientes usuários de prótese removível, parcial ou total, foi feito um alívio e reembasamento dessas próteses com material resiliente (Truesoft, Bosworth, EUA) permitindo que os mesmos usassem socialmente suas próteses, porém sem trazer danos à região enxertada.

4.1.3 Instalação de implantes e obtenção das biópsias

No momento da reabertura desses sítios cirúrgicos para a instalação de implantes osseointegráveis, sete meses após a etapa inicial, e após os procedimentos de anti-sepsia e anestesia já citados,

fragmentos dos enxertos instalados, autólogos e homólogos, foram biopsiados, através do uso de uma broca trefina de 3 mm de diâmetro externo (2 mm de diâmetro interno), e profundidade de 8 mm, montada em contra-ângulo redutor (16:1) e sob irrigação abundante com solução salina estéril. A biópsia foi coletada em uma região que não prejudicava o local escolhido para instalação dos implantes. Esse procedimento era realizado de forma padronizada, para avaliar a qualidade do leito ósseo enxertado sobre o qual eram instalados os implantes de titânio.

Após a retirada da biópsia, o parafuso de fixação desse bloco enxertado foi removido, permitindo que as perfurações para a inserção dos implantes de Titânio fossem realizadas nas posições adequadas. Finalizada essa fase, a sutura e a medicação pós-operatória seguirão os parâmetros já citados.

4.1.4 Processamento das biópsias e avaliação histológica

As biópsias obtidas foram identificadas e fixadas em formol de Lillie (Formol tamponado a 10%)³³ por aproximadamente 72 horas, para manutenção das estruturas que se desejava avaliar.

As biópsias obtidas no momento da instalação dos implantes foram histologicamente processadas da maneira clássica, sendo lavadas em água corrente, durante 24 horas, para remoção do formol, e descalcificadas com imersão em solução descalcificadora de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%)³⁹, trocada a cada 48

horas, durante 80 dias. Constatada a correta descalcificação das peças, as mesmas tiveram o excesso de ácido neutralizado por imersão em solução de Citrato de Sódio a 5% durante 3 dias, com trocas diárias da solução, e foram então lavadas em água corrente durante 24 horas antes do início de sua desidratação, feita em banhos crescentes de álcool (70°, 90°, álcool absoluto). As peças foram então diafanizadas em xilol durante 3 horas, e incluída em parafina.

Foram obtidos 60 cortes com 6 µm de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 6 cortes cada, corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina, permitindo a correta avaliação histológica das estruturas teciduais na região dos defeitos criados.

A avaliação histológica foi feita utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany), com objetivas para aumento de 5 até 100 vezes, e oculares com aumento de 10 vezes, através do qual as imagens foram observadas e avaliadas. As imagens representativas à avaliação feita foram enviadas para um microcomputador, através de uma câmera fotográfica digital Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1.3 megapíxels, acoplada ao microscópio de luz comum, para sua posterior utilização na descrição dos resultados obtidos. Na análise histológica descritiva foram avaliados o tipo e a qualidade dos tecidos neoformados, além da reação tecidual ao enxerto e presença de reação inflamatória.

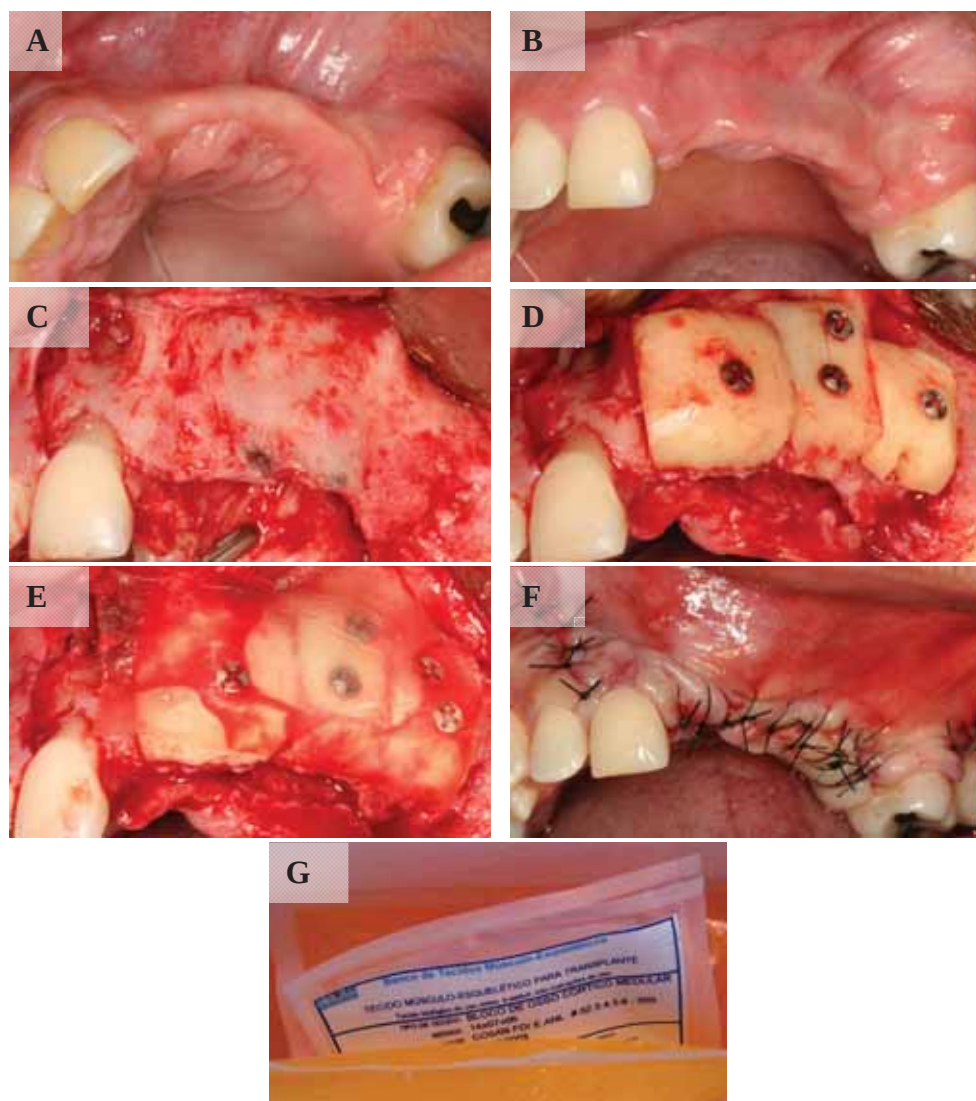


FIGURA 1 – (A) Vista oclusal e **(B)** vista vestibular do aspecto clínico inicial de um dos pacientes tratados com osso homólogo, evidenciando a deficiência de espessura na região dos dentes 21, 22, 23, 24 e 25. **(C)** Leito ósseo preparado para receber enxerto ósseo homólogo. **(D)** Blocos de enxerto ósseo homólogos já trabalhados e fixados ao leito receptor por meio de parafusos de titânio com 1,5 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento e **(E)** recobertos por membrana de colágeno. **(F)** Aspecto final após a sutura do retalho. **(G)** Enxerto ósseo utilizado, ainda acondicionado em sua embalagem e refrigerado.

4.2 Estudo Principal

4.2.1 Amostra

Neste estudo prospectivo de casos clínicos controlados foram avaliadas tomografias, biópsias e amostras de sangue e soro obtidas de 35 pacientes, edêntulos parciais ou totais, de ambos os sexos, e com idade variando entre os 22 e 65 anos, atendidos nos Cursos de Especialização em Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), que buscavam reabilitação oral por meio de implantes osseointegráveis, porém apresentavam defeitos ósseos maxilo-faciais que impossibilitaram a instalação imediata desses implantes, necessitando, portanto, de procedimentos de enxertia óssea. Com o intuito de evitar que o abandono de pacientes durante o andamento da pesquisa atrapalhasse, ou até mesmo impedisse a sua viabilização, o total de 35 pacientes incluídos na pesquisa representou 25% a mais do que a amostra necessária para que os testes estatísticos tivessem poder estatístico adequado (>80%).

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CEP-FO/CAR) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (CONEP-MS) e aprovado sob o protocolo número 36/08 (Anexo 1). Os pacientes confirmaram sua aceitação em participar

do estudo, mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo CEP-FO/CAR (Anexo 2).

Os critérios de inclusão e exclusão de pacientes foi o mesmo reportado para o estudo piloto, no item 4.1.1 desta Tese.

Os 35 pacientes foram divididos em dois grupos, sendo que 15 pacientes receberam enxertos ósseos autólogos, e os outros 20 receberam enxertos ósseos homólogos, obtidos junto ao banco de tecidos músculo-esqueléticos da UniOss (Marília, Brasil), banco esse reconhecido e de funcionamento autorizado pela ANVISA. A alocação dos pacientes em cada um dos grupos não foi randômica por preceitos éticos. Eticamente, o paciente tratado com osso homólogo deve ser informado e consentir sobre o fato. Além disso, como atualmente o osso autólogo é tido como padrão-ouro, só foram tratados com osso homólogo pacientes que não possuíam osso autólogo em quantidade suficiente para enxertia ou aqueles pacientes que apresentavam grande resistência em relação a abertura de uma segunda área cirúrgica para remoção de seu próprio osso. Todos os pacientes foram acompanhados desde o momento da enxertia, e continuam em acompanhamento para a manutenção das próteses sobre implante que estão sendo instaladas sobre esses enxertos, em consultas trimestrais.

4.2.2 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos de enxertia foram realizados conforme descrito no item 4.1.2 desta Tese. A única alteração metodológica foi que, no grupo tratado com osso homólogo, os blocos de tecido ósseo utilizados como biomaterial para enxertia foram córtico-medulares, também obtidos do banco de tecidos UNIOSS (Marília, Brasil). Um dos casos clínicos tratados é exposto como exemplo nas Figuras 2 - 4.

As orientações e cuidados pós-operatórios, a prescrição de medicação sistêmica e tópica e a rotina de remoção de pontos e carregamento protético foram também idênticas ao já descrito no item 4.1.2 desta Tese.

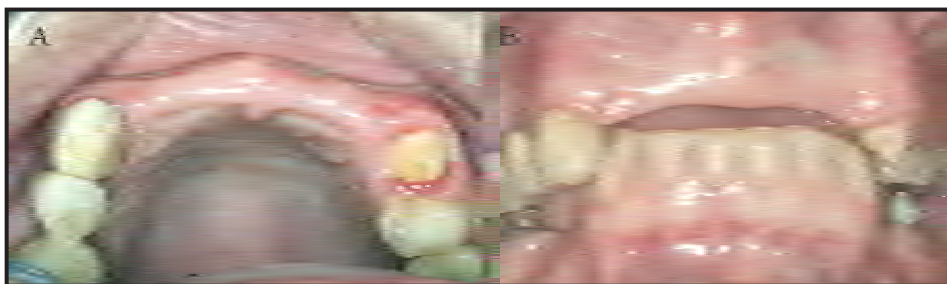


FIGURA 2 – (A) Vista oclusal e **(B)** vista vestibular do aspecto clínico inicial de um dos pacientes tratados com osso homólogo, evidenciando a deficiência de espessura na região maxilar anterior.

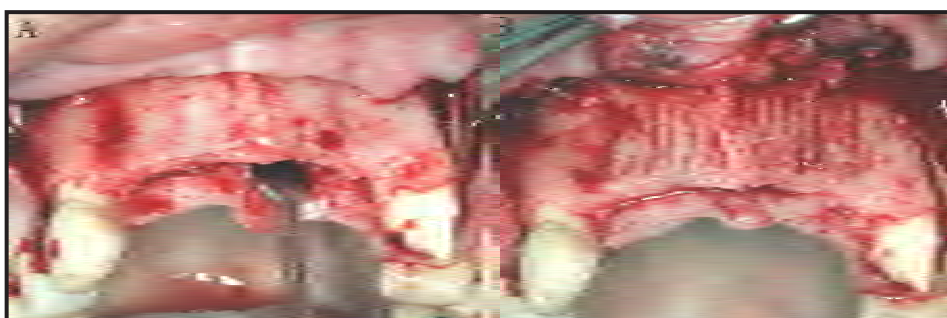


FIGURA 3 – (A) Vista oclusal e **(B)** vista vestibular do leito ósseo sendo preparado para receber enxerto ósseo homólogo.

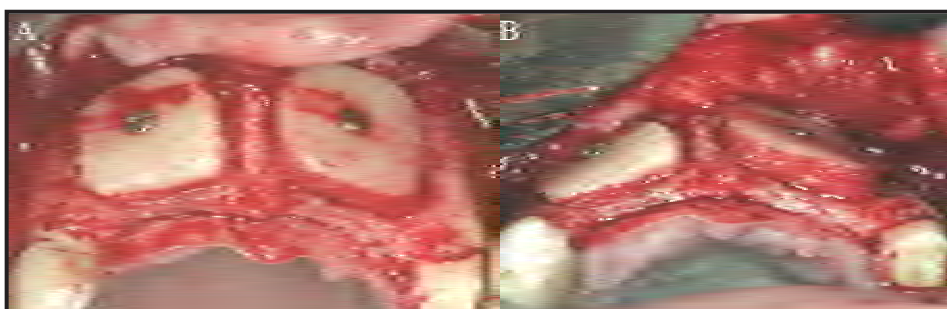


FIGURA 4 – (A) Vista vestibular e **(B)** vista oclusal dos blocos de enxerto ósseo homólogos já trabalhados e fixados ao leito receptor por meio de parafusos de titânio.

4.2.3 Instalação de implantes e obtenção das biópsias

Os procedimentos cirúrgicos de instalação dos implantes e de remoção das biópsias ósseas foram realizados conforme descrito no item 4.1.3 desta Tese. A única alteração metodológica foi que essa reabertura foi realizada aos seis meses pós-operatórios (contra sete meses do estudo piloto).

Nesse momento, na região periférica do enxerto, próximo à região de retirada da biópsia, porém o mais próximo possível da região mais próxima ao ápice do rebordo, um mini-implante, com superfície tratada por ataque ácido, com 2,0 mm de diâmetro e 5,5 mm de comprimento (Neodent, Curitiba, Brasil) foi instalado, após perfuração da região com broca com 1,9 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo redutor (16:1) e sob irrigação abundante com solução salina estéril. Esse implante auxiliou na manutenção da fixação dos blocos ósseos no momento da fixação dos implantes convencionais, impedindo a soltura desses blocos, que muitas vezes ocorre e poderia impedir o prosseguimento da cirurgia. Nos casos aonde a posição do bloco enxertado, seu tamanho, ou a posição do mini-implante, demonstraram risco para a instalação do mini-implante, este não foi instalado.

A região biopsiada e o mini-implante instalado são demonstrados na Figura 5. Finalizada essa fase, a sutura e a medicação pós-operatória seguirão os parâmetros já citados.

Após um período de seis meses para cirurgias na maxila e de quatro meses para cirurgias na mandíbula, no momento da reabertura dos sítios implantados para a colocação de cicatrizadores que permitiram que a reabilitação oral do paciente prosseguisse, e após os procedimentos de anti-sepsia e anestesia já citados, uma biópsia englobando o mini-implante instalado foi realizada, seguindo o mesmo protocolo adotado na biópsia anterior, e também sem trazer prejuízo algum ao paciente ou aos implantes já instalados. A região biopsiada, contendo o mini-implante, está exemplificada na Figura 6. Devido à posição de instalação desses implantes, nem mesmo o retalho de tecido mole foi aumentado além do necessário para a remoção das biópsias. A sutura e a medicação pós-operatória seguiram os parâmetros já citados.

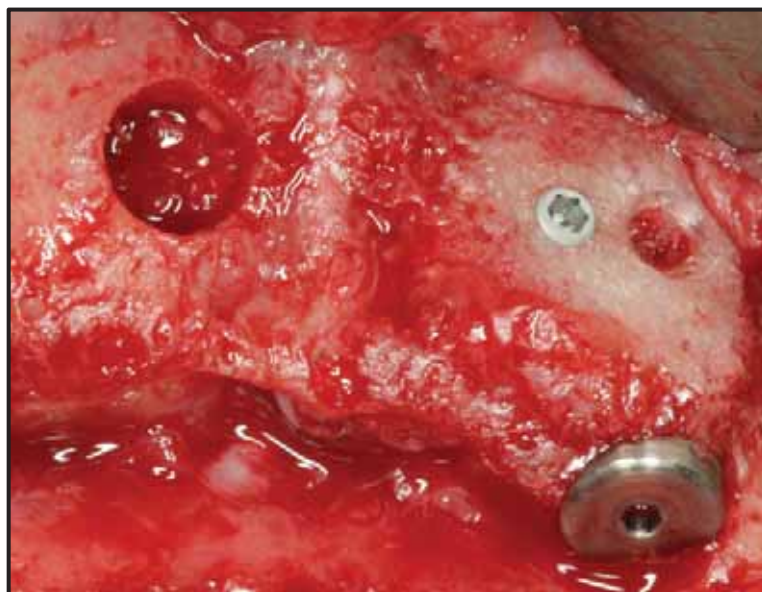


FIGURA 5 – A região biopsiada e o mini-implante já instalado são demonstrados nesta vista vestibular da região tratada.



FIGURA 6 – A região do mini-implante sendo biopsiada, após o período de osseointegração, com uma margem de tecido ósseo para avaliação ao seu redor.

4.2.4 Processamento das biópsias, avaliação histológica e histomorfométrica

Os procedimentos para processamento e avaliação das biópsias ósseas descalcificadas foram realizados conforme descrito no item 4.1.4 desta Tese.

Já a biópsia feita no momento da instalação do cicatrizador, contendo o mini-implante, seguiu para processamento histológico sem descalcificação, em micrótomo de tecidos duros (Sistema Exakt), preservando o implante no corte histológico¹⁶. A análise histomorfométrica dessas peças foi feita para medir diretamente a qualidade e a quantidade de formação óssea ao redor do mini-implante, após o período tradicional no qual se espera que o processo de osseointegração ocorra.

Um corte histológico foi obtido de cada biópsia, da região mais central do mini-implante, e corado com azul de Toluidina. A avaliação histomorfométrica foi feita com base em imagens obtidas utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany), no aumento de 100 vezes. As imagens englobando a região das roscas dos mini-implantes foram enviadas para um microcomputador, através de uma câmera fotográfica digital Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1.3 megapíxels, acoplada ao microscópio de luz comum, e salvas sob a extensão TIF, permitindo que fosse avaliado o contato osso implante (BIC) ao redor do implante como um todo, bem como a quantidade de tecido ósseo neoformado entre as

roscas do implante (BA), sempre na forma de porcentagens (Figuras 7 e 8).

Tanto o BIC como o BA foram avaliados em três regiões distintas, bilateralmente nos mini-implantes instalados, representativas da região “superficial”, “mediana” e “profunda” dos mini-implantes, correspondentes as regiões englobando as roscas 1-2, 7-8 e 13-14, respectivamente. Isso permitiu a obtenção de resultados separadamente para cada região de interesse, que posteriormente foram combinados para prover valores generalizados, referentes a cada mini-implante.

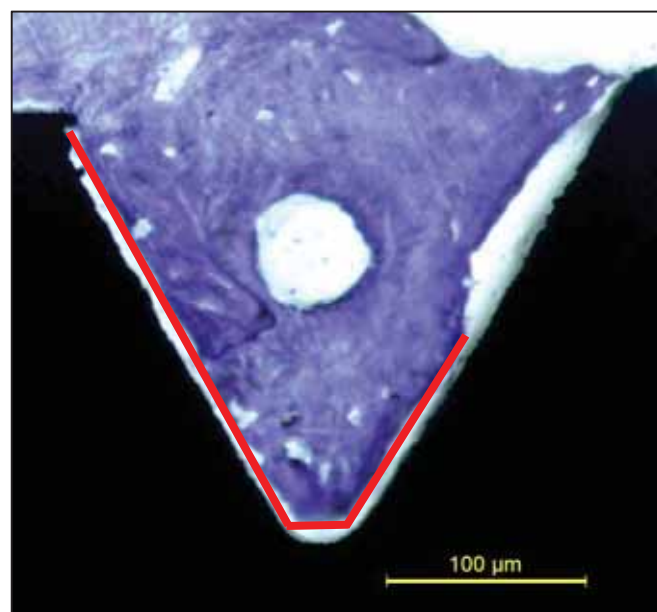


FIGURA 7 – Exemplo de mensuração do contato osso implante (BIC). O comprimento da linha vermelha representa a área aonde o osso toca a superfície do implante, avaliada proporcionalmente ao comprimento total da rosca do implante.

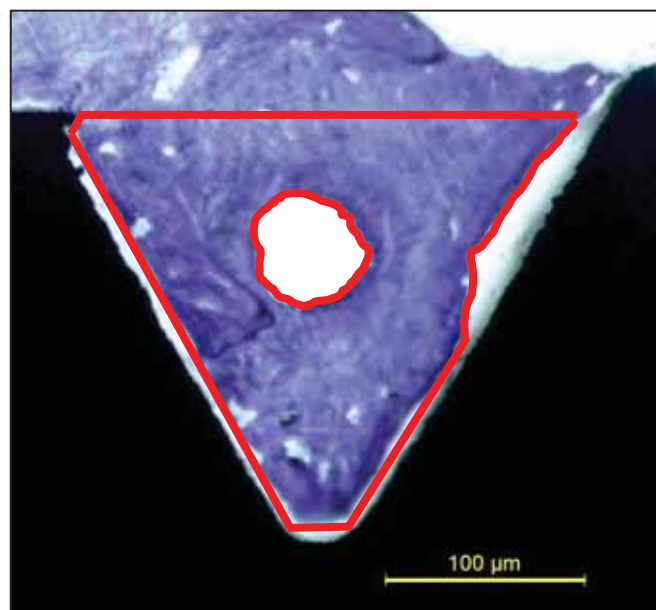


FIGURA 8 – Exemplo de mensuração da área de osso entre as roscas do implante (BA). A linha vermelha demarca a área mensurada.

4.2.5 Avaliação tomográfica

A avaliação tomográfica foi feita com base em imagens obtidas em um tomógrafo de feixe cônico (“cone-beam”), I-CAT Classic (Hartfield, PA, USA). O tamanho de voxel utilizado na geração das imagens foi de 0.25 mm, em uma escala de cinza de 14 bits. Dessa forma, o tamanho de cada pixel da imagem obtida é de 0.125 mm, e a espessura de corte mínima utilizada foi de 0.25 mm, ou seja, dois voxels, aumentando a precisão das medidas que foram feitas sobre essas imagens¹⁹.

Os exames foram realizados em três momentos diferentes, para todos os pacientes: sete dias antes da realização dos enxertos ósseos (evidenciando a real necessidade do mesmo), 14 dias após a realização do enxerto ósseo (permitindo a avaliação pós-cirúrgica imediata do ganho de tecido proporcionado pelo procedimento) e sete dias antes da

instalação dos implantes - ou seis meses após a instalação dos enxertos - (permitindo a avaliação da real quantidade de tecido ósseo neoformado e o planejamento para instalação dos implantes), sendo que em todos os exames um guia tomográfico foi sendo utilizado. Esses guias, feitos com resina acrílica, possuem marcações radiopacas com 1 mm de diâmetro nas posições aonde se espera que os implantes sejam instalados, ou ainda, nas posições aonde os blocos ósseos serão enxertados, permitindo dessa forma que as imagens pudessem ser utilizadas no planejamento dos enxertos, e que as medidas nas imagens pudessem ser feitas de forma padronizada.

Com base nos exames tomográficos, duas diferentes metodologias de obtenção de resultados foram empregadas. Na primeira delas, informações sobre a altura e espessura ósseas na região de realização dos enxertos foram obtidas, com base em medidas lineares (Figura 9), e a correlação desses valores nos três momentos observados foi avaliada.

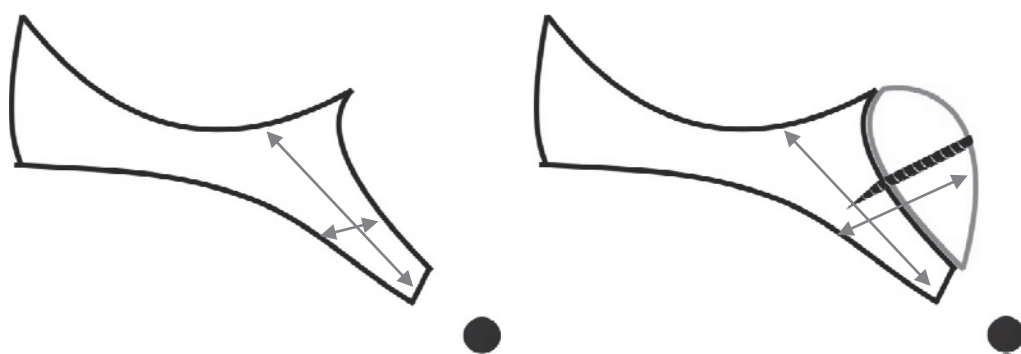


FIGURA 9 – Esquema de corte lateral de maxila, demonstrando as medidas que foram feitas, nos períodos pré e pós-cirúrgico.

Na segunda, mais completa, informações sobre variação volumétrica dos enxertos foram obtidas, com base em medidas de área que representassem o enxerto como um todo, ou seja, utilizando-se imagens representativas do enxerto obtidas a cada 1 mm nas áreas enxertadas, informações sobre a perda de área, e conseqüentemente, volume ósseos, foram obtidas para cada bloco avaliado. Os dados foram obtidos considerando-se o leito ósseo previamente a enxertia, o bloco enxertado, e a característica final da área enxertada (Figuras 10 e 11).

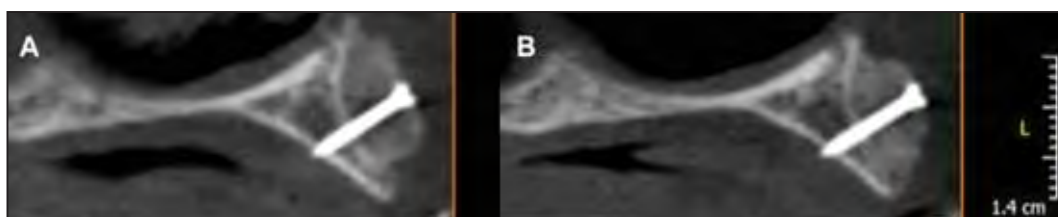


FIGURA 10 – Exemplo das imagens obtidas dos exames tomográficos e que foram utilizadas para a obtenção das medidas, 14 dias (A) e 6 meses (B) após a realização dos enxertos ósseos.

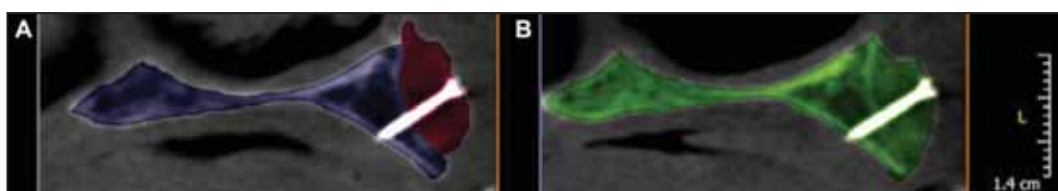


FIGURA 11 – Exemplo das áreas que foram mensuradas nas imagens obtidas dos exames tomográficos. Aos 14 dias (A), o leito ósseo (em azul) e o bloco enxertado (em vermelho) foram medidos separadamente. Aos 6 meses (B), a área óssea total (em verde) foi avaliada.

4.2.6 Avaliação hematológica e sorológica

A avaliação hematológica e a avaliação sorológica foram utilizadas em conjunto para refletir os aspectos imunológicos sistêmicos do uso dos enxertos ósseos homólogos.

Para tal, todos os pacientes foram submetidos a coletas de sangue em cinco momentos diferentes ao longo da pesquisa: uma semana antes da cirurgia de enxerto, quatorze dias após o enxerto, um mês após o enxerto, três meses após o enxerto, e seis meses após o enxerto. Essas coletas foram realizadas em um laboratório especializado (Laboratório São Lucas, Araraquara, Brasil), que fez a coleta de 8 mL de sangue do paciente e, a partir desse volume, realizou o hemograma completo e também a separação de 4 mL de soro.

Para avaliação hematológica, o sangue foi coletado em tubos de vácuo contendo EDTA/K3, e centrifugado sob refrigeração a 1800 g durante dez minutos. As contagens foram feitas com um analisador automatizado Cobra Micro (Roche Pharma Ltda., Reinach, Suíça), e forneceram um perfil quantitativo do eritrograma, leucograma e plaquetas dos pacientes nos diferentes momentos avaliados.

Já o soro, que foi separado do sangue coletado, foi primeiramente microfracionado em alíquotas de 350 µl (que permitiram a realização em triplicata dos testes) e inativado em banho-maria a 56 °C por trinta minutos, previamente ao seu congelamento à -80 °C, até o momento da realização dos testes, na tentativa de impedir que as enzimas do sistema complemento interagissem com as citocinas que foram avaliadas. Foi feita

uma avaliação quantitativa em relação aos marcadores TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10, através do método de ELISA (BD OptEIA Sets, BD, New Jersey, EUA).

Resumidamente, as placas que acompanham os kits foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para cada um dos marcadores escolhidos, diluídos em tampão segundo as normas do fabricante, e incubadas por 18 horas a 4 °C. Após este período os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBD-Tween 20 (PBST) + 10% de soro fetal bovino, por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBST e adicionadas às curvas-padrão para cada marcador em específico, diluídas na razão de 1:2. Nos poços seguintes as amostras dos sobrenadantes de cultura foram distribuídas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o segundo anticorpo biotinilado + streptavidina foi adicionado e incubado por mais uma hora a temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram feitas e a reação foi revelada pela adição de substrato contendo tetra-metil-benzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura feita em um leitor específico de ELISA a 450 nm. Cada uma das amostras, para cada marcador, foi avaliada em triplicata, e a média entre os três valores obtidos foi utilizada como o valor representativo de cada paciente/período para a avaliação estatística.

4.2.7 Análise estatística

Todos os resultados numéricos referentes à análise histométrica, às medidas realizadas sobre as tomografias, e os dados quantitativos obtidos na análise sorológica e hematológica, foram agrupados em tabelas e avaliados estatisticamente.

Para cada um dos métodos de avaliação empregados, e para cada parâmetro avaliado, foi feita uma avaliação estatística personalizada, comparando os dois grupos de estudo nos diferentes períodos observacionais. Os fatores utilizados na escolha do teste estatístico empregado para a avaliação de cada um desses parâmetros foram o tipo de comparação que foi feita (pareada ou múltipla) e a avaliação da normalidade dos dados.

5 RESULTADO

Os resultados desta Tese são apresentados e discutidos em seis artigos descritos a seguir:

Artigo 1:

Spin-Neto R, del Barrio RAL, Pereira LAVD, Marcantonio RAC, Marcantonio E, Marcantonio E Jr. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. Clin Implant Dent Rel Res. 2011 Aug 11 [Epub ahead of print].

Artigo 2:

Spin-Neto R, Coletti FL, Faeda RS, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E. Bone remodeling and implants osseointegration in maxillary grafted areas: comparing fresh-frozen allogeneic bone to the gold standard. Adaptação às normas para envio à Clin Implant Dent Rel Res, em setembro de 2011.

Artigo 3:

Spin-Neto R, Pereira LAVD, Marcantonio E, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr. Incorporação de enxertos ósseos autógenos e homólogos em humanos: Abordagem tomográfica. Implant News. 2010; 7:105-12.

Artigo 4:

Spin-Neto R, Stavropoulos A, Pereira LAVD, Marcantonio Jr E, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. Clin Oral Implants Res. Aceito para publicação em julho de 2011.

Artigo 5:

Spin-Neto R, Coletti FL, Pereira LAVD, Marcantonio E, Marcantonio Jr E. Is peripheral blood-cell balance altered by the use of fresh frozen bone block allografts in lateral maxillary ridge augmentation? Clin Implant Dent Rel Res. 2011 Aug 11 [Epub ahead of print].

Artigo 6:

Spin-Neto R, Freitas RM, Pereira LAVD, Carlos IZ, Marcantonio Jr E. Immune implications of autologous and fresh-frozen allogeneic bone grafting used for ridge augmentation. A systemic analysis. Adaptação às normas para envio à Clin Implant Dent Rel Res, em setembro de 2011.

Clinical Similarities and Histological Diversity Comparing Fresh Frozen Onlay Bone Blocks Allografts and Autografts in Human Maxillary Reconstruction

Rubens Spin-Neto, DDS, MSc;* Ricardo Andrés Landazuri Del Barrio, DDS, MSc;* Luis Antonio Violin Dias Pereira, MD, PhD;† Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, MSc, PhD;‡ Elcio Marcantonio, MSc, PhD;§ Elcio Marcantonio Jr, MSc, PhD¶

ABSTRACT

Background: In the absence of autologous bone for harvesting, fresh-frozen bone allografts turned into an alternative for bone reconstruction procedures.

Purpose: The purpose of this study was to make a histological analysis of fresh-frozen onlay bone allografts (ALs), compared with autografts, in patients who needed maxillary reconstruction prior to dental implants placement.

Materials and Methods: Twelve patients with bone deficiencies (width inferior to 4 mm) in the sites where the implants were planned were enrolled in the study. From these, six were elected to be treated with autogenous (AT) bone grafts and six with fresh-frozen bone AL. This last group included the patients who had absence of a convenient amount of bone in donor sites. Each patient received from one to six graft blocks, totalling to 12 ATs and 17 ALs. Seven months after grafting procedures, biopsies of the grafts were made using 2-mm internal diameter trephine burs, and processed for histological analysis. One biopsy was retrieved from each patient.

Results: Clinically, all grafts were found to be firm in consistency and well-incorporated to the receptor bed. Histological analysis showed a large amount of necrotic bone surrounded by few spots of new-formed bone in the AL group, suggesting low rate of graft remodeling. In the AT group, an advanced stage of bone remodeling was seen.

Conclusions: Human fresh-frozen bone block AL showed clinical compatibility for grafting procedures, although associated to slow remodeling process. Further studies are needed to define, at long term, the remodeling process chronology the clinical longitudinal results for fresh-frozen bone AL.

KEY WORDS: atrophic maxillae, bone allograft, histological analysis

*PhD student, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil; †associate professor, UNICAMP – State University of Campinas, Institute of Biology, Department of Histology and Embryology, Campinas, São Paulo, Brazil; ‡associate professor, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil; §professor, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery, Araraquara, São Paulo, Brazil; ¶professor, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil

Reprint requests: Professor Elcio Marcantonio Junior, Department of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Rua Humaitá, 1680 – CEP, 14801-903-Araraquara-SP, Brazil; e-mail: elciojr@foar.unesp.br

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1111/j.1708-8208.2011.00382.x

INTRODUCTION

The achievement of high success rates in implantology is directly connected to the presence of an adequate bone volume, to permit and maintain the osseointegration of dental implants through the time.^{1–3} Bone volume is normally diminished by tooth loss, trauma, periodontal disease, and other pathologies,^{4,5} and the most predictable process to rehabilitate patient's bone architecture is bone grafting, before implants placement.^{6–8}

The gold standard for bone grafting is autogenous (AT) bone,^{9,10} harvested from extra-^{11–14} or intra-oral^{15–17} donor sites. AT bone graft is accepted as a highly predictable and effective method, without immunologic impediments.^{9,18–20} However, this technique is associated to disadvantages such as postsurgical pain, increased

blood loss, risk of paresthesia and infection, and in several cases, with deficiencies in the quality and quantity of available bone donor sites, providing an insufficient bone volume to be grafted prior to implants placement.²¹

In the absence of AT bone for harvesting, fresh-frozen bone allografts (ALs) turned into an alternative, in view of the fact that it provides a reasonable source for grafting material.^{6,7,22–24} During the last two decades, the use of fresh-frozen bone AL has significantly increased.^{25,26} This fact is directly related to the establishment of severe guidelines for bone processing, which defined the donor selection, how the bone must be harvested, processed, and stored, together with the record-keeping procedures that must be respected. The increased the safety of this bone graft, and the recent absence of reports on cross-contamination in its clinical use, considering diseases such as hepatitis or HIV, makes the fresh-frozen bone AL an alternative to autografts.^{27–40} Another concern about bone ALs is their possible antigenicity, but there is still limited information regarding this issue.⁴¹

The purpose of this study was to make a histological analysis of fresh-frozen bone onlay ALs, compared with autografts, in patients who needed maxillary reconstruction prior to implants placement.

MATERIALS AND METHODS

This research protocol was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee (CEP-FO/Car) and by the National Research Ethics Committee (CONEP-MS), under protocol number 36/08. All treatments were performed in the Department of Periodontology, Araraquara Dental School (UNESP – Univ. Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil.

A total of 12 partially or totally edentulous patients (five males and seven females, age ranging from 25 to 60 years), who desired oral rehabilitation with titanium implants and had at least one site with severe bone deficiency (i.e., <4 mm alveolar ridge width) not allowing the placement of a regular size implant, were treated. Alveolar ridge width was determined on the cross-sectional image section view of cone beam computed tomography (CBCT) (i-CAT Classic, Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA), generated images (DICOM-based data sets) with a resolution of 96 dpi, 14-bits gray scale and 0.25 mm voxel size, and set to 120 kVp, 5 mA, with a 20-second exposure time. None

of the patients presented with systemic diseases affecting bone turnover, or were pregnant or lactating, or had habits that could interfere with treatment (for example, smoking, alcoholism, and drug use). Treatment allocation in the present study was not randomly assigned. Patients judged as not having adequate amounts of donor (autologous) bone were treated with fresh-frozen bone ALs. This decision was taken based on the clinical screening and CBCT examinations and depended on the amount of bone resorption and/or number of sites requiring reconstruction in each patient. Following these criteria, six patients were elected to be treated with ATs and six with fresh-frozen bone ALs.

The AL was processed according to American Association of Tissue Banks (AATB) guidelines⁴² in an bone tissue bank (UniOss, Marília, Brazil) authorized by the Brazilian Ministry of Health. During the first surgical phase and under local anesthesia, a total flap was attained to provide a full visualization of the bone defect. Any reminiscent of soft tissues were removed from the bone surface, and delicate burs were used, always under intense saline solution irrigation, to etch the host cortical bone allowing the vascularization to occur in an easier way toward the grafts.

In the AL group, the cortical bone blocks were removed from the freezer and were put into sterile saline solution for 10 minutes before surgical procedure, to hydrate and gradually get to room temperature. The cortical ATs were harvested from the mandibular retro-molar region, following the classic technique.⁴³ For both groups, all graft blocks were prepared with careful trimming using #700 cylindrical and maxi-cut burs, always under abundant sterile saline solution irrigation, and adjusted to the host site. The graft blocks were fixated to the host bone site using 1.5 × 10-mm screws (Neodent, Curitiba, Brazil) and covered by a collagen membrane (Genius Baumer, São Paulo, Brazil) prior to the interrupted nylon 4-0 suture (Figure 1). Each patient received from one to six graft blocks, totalling to 12 ATs and 17 ALs.

All patients received antibiotics (Amoxicillin 500 mg, three times daily for 7 days), nonsteroidal anti-inflammatory treatment (Nimesulide 100 mg, two times daily for 5 days), and analgesics (Acetaminophen 750 mg, according to individual needs). Patients continued to rinse with Chlorhexidine digluconate for the following 7 days. Sutures were removed 14 days after surgery.



Figure 1 One of the treated cases in the bone allografts group. The grafts trimmed and installed with fixation screws.

At the second surgical phase, 7 months after the grafting procedure, a 2-mm internal diameter trephine bur was used to retrieve a biopsy containing the grafted and native bone areas. The biopsy was carefully obtained perpendicularly to the graft (Figure 2). One biopsy was retrieved from each patient.

The retrieved biopsies were routinely processed for light microscopy, and 6-mm thin sections stained with hematoxylin-eosin were used for descriptive histological analysis using a DIASTAR light microscope (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Germany) connected to a Leica Microsystems DFC-300-FX digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Observations were made in the whole biopsy looking for a comparison between grafted and the native bone that allowed the distinction of three areas: (1) area comprising the pre-existing residual bone (e.g., residual maxillary bone); (2) area comprising the interface between the grafted bone and the host bone; and (3) area comprising the still unremodeled area of the graft bone. The delineation of the unremodeled bone was made based in histological criteria, e.g., absence of nucleus in osteocytes lacunae and local absence of capillaries.

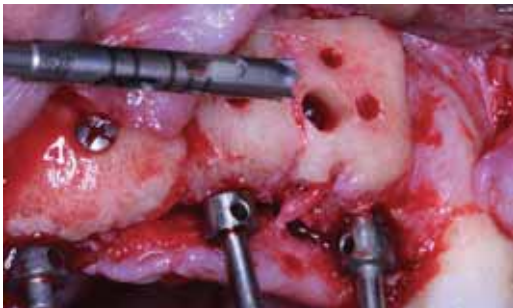


Figure 2 Biopsy retrieval, in a place that does not interfere in implants placement. The biopsy contain sample of the grafted and native bone areas.

RESULTS

The surgical approach used in the patients presented in this study allowed implant placement without significant inflammatory reaction, for both treated groups. During the healing period, the patients used tooth-supported, fixed or removable, prostheses. Healing proceeded within normal limits with no complications and the bone grafts showed adequate bone adaptation when the sites were reopened, permitting that implants were placed and bone biopsies were retrieved without any loss for the patient. All retrieved biopsies (a total of 12) were suitable for macro and microscopic analysis.

Implants (a total of 40) were placed with a minimum of 35 Ncm of torque in all cases, in the augmented sites. All patients were able to proceed to the prosthetic phase of the treatment.

Clinically, the AL group showed signs of a delayed remodeling compared with the AT group, because there was the perception of large amounts of unremodeled bone in the former group (Figure 3, A and B). The macroscopic analysis of the biopsies, using a

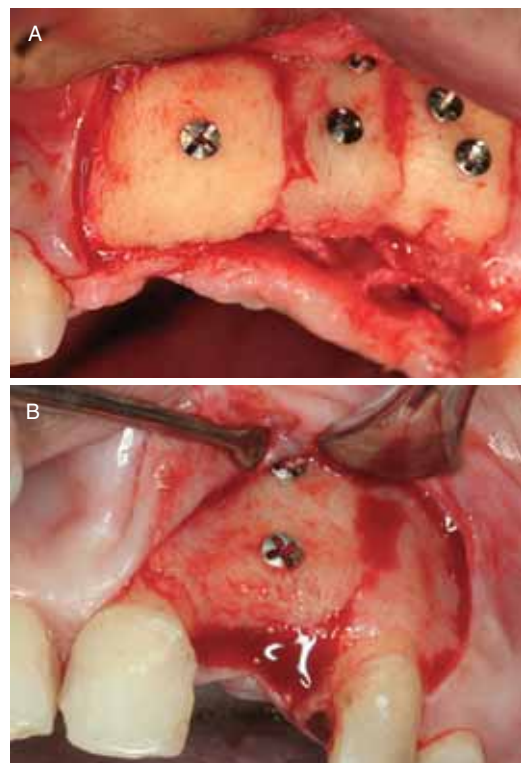


Figure 3 Examples of the grafted sites seven months after first surgery. In the bone allografts-treated group (A), the macroscopic difference between the host bone and the grafted material is clear, suggesting not complete bone remodeling. In the autogenous bone grafts group (B), the macroscopic analysis of the grafted material shows signs of advanced remodeling.

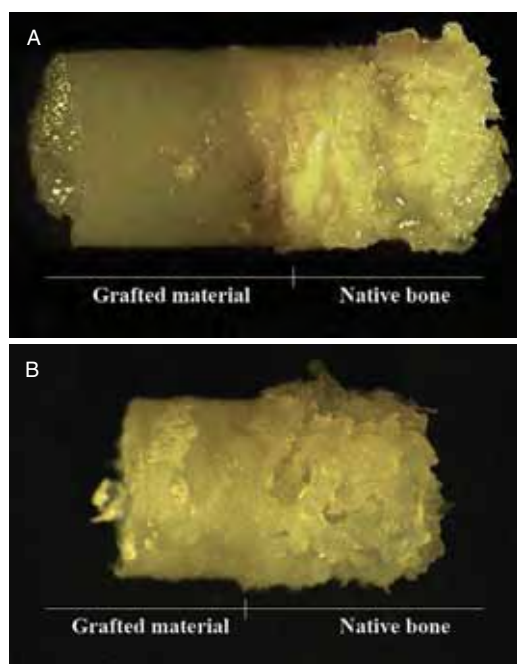


Figure 4 Stereomicroscopic view of one of the retrieved biopsies. In the bone allografts group (A), the difference between the native bone and the grafted material is clear, although there is evidence of continuity and biocompatibility between these two segments. In the autohenous bone grafts group (B) is difficult to delimitate the boundaries between the non-remodeled and remodeled grafted material.

stereomicroscope, confirms the clinical perceptions, showing in all six cases of AL group reminiscent and apparently quiescent large areas of the original cortical of the AL. In the AT group, those boundaries were unclear and it was not visible as in the AL group (Figure 4, A and B).

The microscopic analysis of the biopsies from the AL group showed large and predominant segments of necrotic bone (as seen on Figures 5 and 6, in the small frame showing the full biopsy view), with empty osteocytes lacunae and little or devoid osteoclastic activity. Frequently, blood vessels were seen invading the Haversian canals of the grafted material. Although revascularization, not completed, was a feature present at 7 months after AL, only in very few areas active osteoblasts within the Haversian canals were present indicating that a centrifugal bone remodeling process is plausible, but very limited (see Figure 6). These remodeling areas were recognized by the presence of newly formed primary bone. In addition, no direct contact between the remodeled bone and the grafted bone could be seen (see Figure 5), and there was still a clear separation between the residual bone and the grafted material,

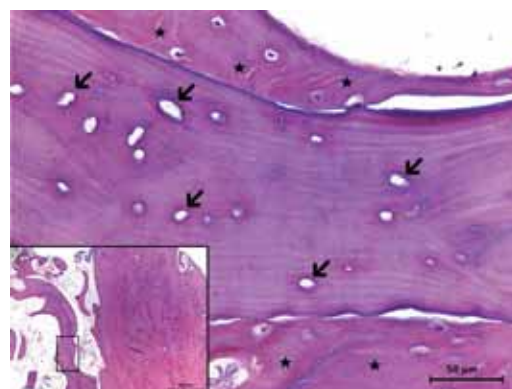


Figure 5 Photomicrograph of an overview of the biopsy area corresponding to the bone allografts, with all bone on the right side of the biopsy still necrotic (in the frame). Higher magnification (of the area corresponding to the rectangle) showing the great volume of necrotic bone, with empty osteocytes lacunae (→) reminiscent from the graft material. In very few areas, the necrotic bone was surrounded, by newly formed bone (*), showing exuberant osteocytes, although it is not directly attached to the host site.

as observed in stereomicroscopy analysis. In the interfaces between the grafted AL and the host site, the remodeling process was usually more advanced than in the boundaries of the graft. In the AL group, there were some osteoclastic activity, surrounded by a connective fibrous tissue with a lack of inflammatory cells, but newly formed bone failed to invade the graft itself.

In the AT group, small or no areas of necrotic bone could be seen in the full biopsy (as seen on Figure 7, in the small frame showing the full biopsy view), with exuberant osteocytes all over the chosen fields of view (see Figure 7). The presence of several reversion lines

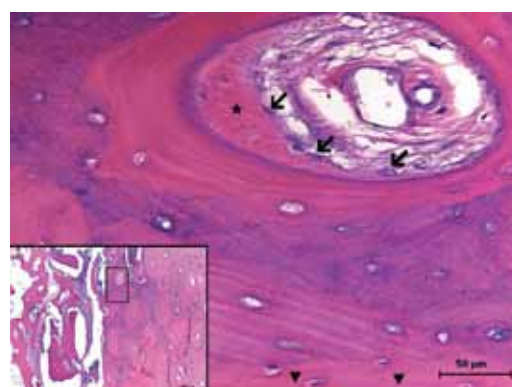


Figure 6 Photomicrograph of an overview of the biopsy area corresponding to the bone allografts (in the frame). In the higher magnification, blood vessels penetrating in the original Haversian system of the grafted bone, with active osteoblasts (→) and newly formed primary bone (*) can be seen. In the boundaries, remodeled and viable bone can be seen (▲), integrated to the grafted material (still necrotic).

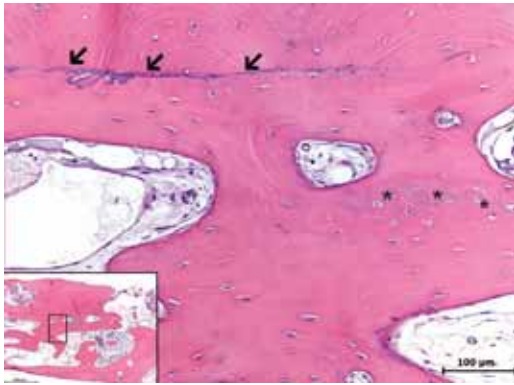


Figure 7 Photomicrograph of an overview of the biopsy area corresponding to the autogenous bone grafts (in the frame). The higher magnification shows an advanced remodeling stage with several reversion lines and lamellar bone, without the presence of necrotic bone. A large number of exuberant osteocytes in lacunae is associated to non lamellar arrangement typical of newly remodeled bone (*).

indicate advanced stage of remodeling of these grafts, with no perception of difference between the grafted and the host bone, as previously shown in the stereomicroscopy analysis (see Figure 7). Considering all blocks from the AT group, it is observed that the largest area of the grafts were completely remodeled after 7 months, and were already integrated to the host bone site because the difference between the residual bone and grafted material was almost inexistent.

DISCUSSION

In the last years, bone has been the second most transplanted tissue – blood is the most common.⁴⁴ ALs are one of the possible alternatives for AT and, in the last decade, its use has increased 15-fold, accounting for about one-third of bone grafts performed in the United States (considering its use in dentistry and orthopedics).^{7,45,46} The advantages of using bone ALs include the decreased operative time and trauma for the patient, and a theoretically unlimited supply of reconstructive material, allied to decreased blood loss and absence of donor site morbidity.⁴⁷

However, there are some disadvantages in using AL, and the most visited are the different biological properties compared with AT,⁴⁴ and the risk of disease transmission and antigenicity.²⁵ Regarding the risk of disease transmission, there is a wide range of studies that state that AL represent a minimal risk to the patient.⁹ If we consider the bone-tissue banks that are based on the AATB standard protocols, the risk of viral transmission by unprocessed deep-frozen, nonirradiated grafts from

screened donors is currently less than 0.0005% for hepatitis C virus and 0.0001% for HIV.⁴⁸

AL do not provoke severe marked immune responses and has acceptable compatibility with the recipient site, although there are not many long-term studies regarding this issue so far.⁴⁹ All patients treated in this study, in both AL and AT groups, presented good systemic health after the bone-grafting procedures, without any signs of contamination or immunological incompatibility problems.

Regarding the biological properties is already well established that the processing of AL tissue, even if only antibiotic washing and deep freezing are used, although lowers this risk of cross-infection, can significantly weaken the biologic and mechanical properties initially present in the bone tissue.^{21,50} Through our histological evaluation, it could be seen that the AL-grafted bone showed biocompatibility, without signs of inflammatory reactions toward it. However, in disagreement to some previous results reported in the literature,^{9,51} we observed that AL, in the macro and microscopic analysis, showed predominance amount of nonremodeled bone. This last (and important) characteristic was not seen in the AT group, where the majority of the grafted material was already remodeled and showed characteristics of vital bone. This agrees with Zerbo et al.'s⁵² findings that the final volume of nonvital bone, evaluated from 2.5 to 7 months after AT cortical block bone grafting in the human maxilla, ranged from 1% to 34%.

Confronting our histological findings, there are some articles that state that AL can retain some osteoinductive properties, with the preservation of bone morphogenetic proteins in spite the protocols regarding this biomaterial's attainment, which allow the new-bone deposition.^{53–56} Some studies of maxillary ridge augmentation using fresh-frozen bone ALs revealed living and newly formed bone incorporated with the grafted areas.^{53–56} Unlike our results, the literature suggests that grafted bone would be incorporated without the reminiscence of grafted material, even at 7 months after grafting surgery.⁹ In opposition to this idea, and corroborating our findings, there are also articles regarding inadequate revascularization, little creeping attachment, and decreased mineral accretion associated to a small number of cells working in the remodeling process of the fresh-frozen bone ALs.^{6–8}

Recent articles even relate the impairment in these grafts remodeling process with a low level of receptor

activator of nuclear factor kappa B ligand and vascular endothelial growth factor compared with the levels related to autografts.⁵⁷ All these articles concluded that under all circumstances, bone ALs function histologically and biologically poorly compared with autografts, mainly if we consider the first 12 months following the bone-graft surgery,⁶ and this is consistent with the results of the analysis of biopsies demonstrated in our study.

The delayed remodeling of the AL, evidenced in our study by little or no presence of active osteoclasts and osteoblasts, could have direct implications over its clinical use. In medical orthopedic surgery, the limited bone forming and remodeling of structural ALs is directly associated with the 25–35% failure rate within 3 years because of infection, fracture, and nonunion. The fractures at this late stage are the result of the accumulation of microcracks that cannot be repaired by the necrotic bone because there is no vascular supply. As a result of this poor clinical success, the use of structural ALs has been restricted to repair segmental defects following tumor resection in cancer patients.⁵⁸ In our study, although there was a biological delay in these grafts remodeling process, the installation of titanium implants at the correct site was possible, according to other results present in literature.⁵¹ This makes clear that AL grafts acted only as an osteoconductive biomaterial, without any osteogenic or osteoinductive properties, such as shown by AT.²¹ However, the effects of these biological events in long-term clinical results of fresh-frozen bone ALs in maxillary bones, and the success rate of implants and implant-supported prosthesis installed over them remain unclear.

CONCLUSION

Although limited, our results showed that AL is histologically inferior compared with AT, especially regarding the delayed remodeling process shown by the AL. On the other hand, AT and AL presented biocompatibility and allowed the installation of titanium implants in the planned 3-D position. Long-term studies are urgently needed to elucidate the remodeling process chronology for AL, and delimitate the clinical consequences of substituting AT by AL.

REFERENCES

1. Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y, Tsuru H. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study. *J Prosthet Dent* 1992; 68:813–816.
2. Sahin S, Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. II: a morphometric evaluation after three months of loading. *J Prosthet Dent* 1996; 76:176–180.
3. Wadamoto M, Akagawa Y, Sato Y, Kubo T. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. I: a morphometric evaluation in initial healing. *J Prosthet Dent* 1996; 76:170–175.
4. Barber HD, Betts NJ. Rehabilitation of maxillofacial trauma patients with dental implants. *Implant Dent* 1993; 2:191–193.
5. Wiens JP. The use of osseointegrated implants in the treatment of patients with trauma. *J Prosthet Dent* 1992; 67:670–678.
6. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 225:7–16.
7. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty* 1993; 4:58–63.
8. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics* 1994; 17:809–810, 821.
9. Contar CM, Sarot JR, Bordini J, Jr., Galvao GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1280–1285.
10. Ladd AL, Pliam NB. Use of bone-graft substitutes in distal radius fractures. *J Am Acad Orthop Surg* 1999; 7:279–290.
11. Catone GA, Reimer BL, McNeir D, Ray R. Tibial autogenous cancellous bone as an alternative donor site in maxillofacial surgery: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:1258–1263.
12. Donovan MG, Dickerson NC, Hanson LJ, Gustafson RB. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:588–594.
13. Donovan MG, Dickerson NC, Mitchell JC. Calvarial bone harvest and grafting techniques for maxillary and mandibular implant surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 1994; 2:109–122.
14. Keller EE, Triplett WW. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1987; 45:11–14.
15. Capelli M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23:277–285.
16. Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent* 1995; 4:261–267.
17. Nowzari H, Aalam AA. Mandibular cortical bone graft part 2: surgical technique, applications, and morbidity. *Compend Contin Educ Dent* 2007; 28:274–280; quiz 281–272.
18. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:28–42.
19. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:187–196.

20. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics* 2004; 27:488–495; quiz 496–487.
21. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent* 2003; 12:217–226.
22. Collins M, James DR, Mars M. Alveolar bone grafting: a review of 115 patients. *Eur J Orthod* 1998; 20:115–120.
23. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1988; 226:292–298.
24. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:151–162.
25. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:333–335.
26. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:15–21.
27. Aguirre Herrera P, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Chile. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:153–156.
28. Barcena A, Kapidzic M, Muench MO, et al. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. *Dev Biol* 2009; 327:24–33.
29. Bui MM, Smith P, Agresta SV, Cheong D, Letson GD. Practical issues of intraoperative frozen section diagnosis of bone and soft tissue lesions. *Cancer Control* 2008; 15:7–12.
30. Gamero EC, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Peru. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:167–171.
31. Hilmy N, Manjas M, Ferdiansyah, Abbas B, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Indonesia. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:103–107.
32. Kang YK, Yim CJ, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Korea. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:109–113.
33. Lobo Gajiwala A, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in India. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:93–101.
34. Martinez-Pardo ME, Morales Pedraza J, Sanchez Ramirez O. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Mexico. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:157–165.
35. Morales Pedraza J, Phillips GO. The evolution and impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Asia and the Pacific region. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:87–91.
36. Morales Pedraza J, Phillips GO. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Asia and the Pacific and the Latin American regions. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:79–86.
37. Morales Pedraza J, Sanchez Noda EO, Rodriguez Cardona RL, Otero I. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Cuba. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:149–152.
38. Nather A, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Singapore. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:119–124.
39. Vajaradul Y, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Thailand. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:125–132.
40. Yusof N, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Malaysia. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:115–117.
41. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989; 24:891–905.
42. American Association of Tissue Banks. 16th Annual meeting. August 24–26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993; 33:610–621.
43. Raghoobar GM, den Hartog L, Vissink A. Augmentation in proximity to the incisive foramen to allow placement of endosseous implants: a case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68:2267–2271.
44. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36(Suppl 3):S20–S27.
45. Bridwell KH, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C, Blanke K. Posterior spinal fusion supplemented with only allograft bone in paralytic scoliosis. Does it work? *Spine* 1994; 19:2658–2666.
46. Carter G. Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J* 1999; 70:660–670; quiz 672–666.
47. Perrott DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 21:260–265.
48. Albert A, Leemrijse T, Druez V, Delloye C, Cornu O. Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study of bone grafting. *Acta Orthop Belg* 2006; 72:734–740.
49. Stevenson S, Li XQ, Davy DT, Klein L, Goldberg VM. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79:1–16.
50. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993; 13:29–45.

51. Carinci F, Brunelli G, Franco M, et al. A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010; 12:91–98.
52. Zerbo IR, de Lange GL, Joldersma M, Bronckers AL, Burger EH. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14:759–766.
53. Jensen J, Sindet-Pedersen S, Oliver AJ. Varying treatment strategies for reconstruction of maxillary atrophy with implants: results in 98 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:210–216; discussion 216–218.
54. Kahnberg KE, Nystrom E, Bartholdsson L. Combined use of bone grafts and Branemark fixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4:297–304.
55. Keller EE, Van Roekel NB, Desjardins RP, Tolman DE. Prosthetic-surgical reconstruction of the severely resorbed maxilla with iliac bone grafting and tissue-integrated prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987; 2:155–165.
56. Picos MA. Buccolingual expansion of the maxillary ridge. *Dent Implantol Update* 1992; 3:85–87.
57. Ito H, Koefoed M, Tiyyapatanaputi P, et al. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat Med* 2005; 11:291–297.
58. Corsi KA, Schwarz EM, Mooney DJ, Huard J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. *J Orthop Res* 2007; 25:1261–1268.

**Bone remodeling and implants osseointegration in maxillary grafted areas:
comparing fresh-frozen allogeneic bone to the gold standard.**

Rubens Spin-Neto, MSc^a; Felipe Leite Coletti, MSc^a; Rafael Silveira Faeda, PhD^b; Luís Antônio Violin Dias Pereira, PhD^c; Elcio Marcantonio Jr, PhD^a.

^aDepartment of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Implantology, UNIARA – Araraquara University, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^cDepartment of Histology and Embryology, UNICAMP – State University of Campinas, Institute of Biology, Campinas, São Paulo, Brazil.

Running title: Bone remodeling and implants osseointegration in grafted regions

Key-words: *Bone allograft; bone autograft; ridge augmentation; osseointegration; histological evaluation.*

Corresponding author:

Rubens Spin Neto

Department of Periodontology - UNESP, São Paulo State University

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14801-903 - Araraquara-SP, BRAZIL

Fax: 55-16-3301-6369/3301-6378

E-mail: netorubens@yahoo.com.br

Bone remodeling and implants osseointegration in maxillary grafted areas: comparing fresh-frozen allogeneic bone to the gold standard.

Abstract

Background: The biological performance of fresh-frozen bone allografts, especially regarding the osseointegration of implants in the grafted areas, remains as a poorly addressed issue in literature. **Purpose:** to make a qualitative histological analysis of fresh-frozen bone onlay allografts, compared to autografts, followed by a quantitative histomorphometric analysis of titanium implants placed in the grafted areas. **Material and methods:** Thirty-four partially or totally edentulous patients treated either with fresh-frozen allogeneic bone (AL – 20 patients) or autologous bone onlay block grafts (AT – 14 patients) prior to implant placement, were included in this analysis. Six months after grafting procedures, biopsies of the grafts were made using 2 mm internal-diameter trephine burs, and processed for histological analysis. At this moment, a mini-implant was installed in the grafted area and biopsied when the implants were re-opened for healing abutments installation. Histomorphometric analysis of these samples assessed the bone-to-implant contact (BIC) and the bone area between the threads (BA) of the mini-implant. **Results:** Histological analysis showed the presence of necrotic bone surrounded by spots of new-formed bone in the AL group, opposing to an advanced stage of bone remodeling in AT group. In histomorphometric analysis, no differences between the studied groups were found for BIC and BA. **Conclusions:** AL showed a slower remodeling process compared to AT, although the short-term evaluation of osseointegration parameters showed similar results considering areas augmented with both materials.

Introduction

Literature considers the presence of an adequate bone volume as one of the most important factors connected to high success rates in implantology, since it allows the correct three-dimensional placing of the implants, supporting the process of osseointegration.¹⁻⁴ Commonly, bone availability does not go toward this pre-requirement, since there are several local and systemic factors, such as tooth loss, trauma, periodontal disease and other pathologies that might diminish the amount of available bone.^{5, 6} When clinical situations in which the amount of available bone take place, one of the most predictable way to enable the oral rehabilitation of the patient is to use reconstructive techniques, such as bone grafting, must be engaged to restore bone anatomy, before the placement of implants.⁷⁻¹⁰

The use of autologous bone as a grafting material is considered the gold standard for bone augmentation procedures¹¹⁻¹⁹, appearing as the best documented, and considered as a highly effective and predictable method.^{11, 14-22} Nevertheless, this technique is also associated to some disadvantages, mainly connected to the donor site, such as post-surgical pain, increased blood loss, risk of paresthesia, deficiencies in the quality and quantity of available bone, and infection which shows the necessity of applying different materials to take care of the bone deficiencies.²³⁻²⁵

One of the substitutive materials for bone autografts which has been increasingly cited by literature in the last years is fresh-frozen allogeneic bone, especially in view of the fact that it provides a reasonable source for grafting material, without the necessity of creating a second – donor – surgical area.^{7, 8, 11, 25-32} Other

advantages, such as ease of obtaining, reduced surgical time and availability, make this material a plausible clinical alternative.^{26, 33}

One of the facts that put this substitute to autologous bone in the hall of the viable alternatives for bone augmentation procedures was the establishment of severe guidelines for bone processing, made by authorized bone-tissue banks, which defined the donor selection, how the bone must be harvested, processed and stored, together with the record-keeping procedures that must be respected.^{31, 32, 34} These processing protocols increased the safety of using fresh-frozen allogeneic bone grafts, and there is an absence of reports on crossed-contamination in its clinical use, considering diseases such as hepatitis or HIV.^{24, 35-48}, there are still concerns regarding the antigenicity and immunogenicity of allografts.^{49, 50}

Another concern regards the biological performance of bone allografts, since when faced to the gold standard, literature shows inferior biological outcomes for fresh-frozen allogeneic bone grafts, such as slower remodeling and an exclusively osteoconductive action.^{51, 52} One recent paper also focus on a reduced implant osseointegration success-rate⁵³, but it is evident that there is still a lack of standardized, long-term, human studies on this issues^{51, 52, 54}, since even when the gold-standard is used for augmentation procedures, clinical studies have shown a higher degree of implant failures in grafted bone compared with normal non-grafted maxillary bone.⁵⁵

The aim of this study is to make a qualitative histological analysis of fresh-frozen bone onlay allografts, compared to autografts, in patients who needed maxillary reconstruction prior to implants placement, followed by a quantitative histomorphometric analysis of titanium implants placed in the grafted areas.

Materials and Methods

The research protocol of this controlled case series was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee (CEP-FO/Car) and by the National Research Ethics Committee (CONEP-MS) under the protocol number 36/08, and it is in accordance to the World Medical Association Declaration of Helsinki (2002). All treatments were performed in the Department of Periodontology, Araraquara Dental School (UNESP – Univ. Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil.

Patient selection

A total of 34 partially or totally edentulous patients 12 male and 22 female, with an average age of 47 years (ranging from 27 to 69), who desired oral rehabilitation with titanium implants and had at least one site with severe bone deficiency (i.e., <4 mm alveolar ridge width) not allowing the direct placement of a regular size implant, were treated from May to December 2009. Alveolar ridge width was determined on the cross-sectional image section view of CBCT (i-CAT Classic, Imaging Sciences International, USA) generated images (DICOM-based data sets) with a resolution of 96 dpi, 14-bits gray scale and 0.25 mm voxel size. The CBCT unit was set at 120 kVp, 5 mA, with a 20 sec. exposure time. None of the patients presented with systemic diseases affecting bone turnover, or were pregnant or lactating, or had habits that could interfere with treatment (for example: smoking, alcoholism and drug use).

Treatment allocation in the present study was not randomly assigned. Patients judged as not having adequate amounts of donor (autologous) bone were treated with fresh-frozen bone allografts. This decision was taken based on the clinical

screening examination and the CBCT examination and depended on the amount of bone resorption and/or number of sites requiring reconstruction in each patient. Following these criteria, 20 patients were treated with fresh-frozen allogeneic bone grafts (AL) and 14 with autologous bone grafts (AT).

To fulfill Brazilian regulations, documents regarding the allogeneic biomaterial request were filled-out and sent to the registered bone bank that supplied the allografts (UniOss, Marília, Brazil) previously to the surgeries. The fresh-frozen allogeneic bone was collected and processed according to the American Association of Tissue Banking guidelines – AATB.³⁴

Surgical procedures

Immediately prior to the augmentation surgery, all patients performed a mouth rinse with 10-15 ml 0.12% chlorhexidine digluconate for one minute and povidine-iodine 10% solution was applied to the peri-oral skin.

Under local anesthesia a full thickness flap was raised to provide a full visualization of the alveolar ridge. Any reminescent soft tissues were removed from the bone surface, and delicate burs were used under intense saline solution irrigation to penetrate the host cortical bone for enhancing vascularization towards the base of the grafts. In the AT group, grafts of adequate size according to defect dimensions were retrieved from the mandibular ramus. In the AL group, standard size cortico-cancellous bone blocks (15 x 10 x 6 mm) were removed from the freezer and put into sterile saline solution for 10 minutes, allowing them to hydrate and obtain room temperature gradually. For both groups, the blocks were trimmed to fit the defects using cylindrical and maxi-cut burs under abundant sterile saline solution irrigation. The blocks were fixed with the

cancellous bone side facing the host bone using 1.5 mm in Ø x 10 or 12 mm long titanium screws (Neodent, Curitiba, Brazil) and covered by a collagen membrane (Genius Baumer, São Paulo, Brazil). Finally, the flaps were repositioned to cover the grafts completely and were sutured with interrupted nylon 4-0 single sutures. As a post-surgical protocol, all patients received antibiotics (Amoxicillin 500 mg) three times daily for seven days, non-steroidal anti-inflammatory treatment (Nimesulide 100 mg) two times daily for five days, and analgesics (Acetaminophen 750 mg) according to individual needs. Patients continued to rinse with chlorhexidine digluconate for the following 7 days. Sutures were removed 14 days after surgery.

Bone biopsies retrieval and evaluation

At the second surgical phase, six months later the grafting procedure, a 2 mm internal diameter trephine bur was used to retrieve a biopsy containing the grafted and native bone areas. The biopsy was carefully obtained perpendicularly to the graft. One biopsy was retrieved from each patient.

The retrieved biopsies were routinely processed for light microscopy, and 6-µm thin sections stained with hematoxylin-eosin (HE) were used for descriptive histological analysis using a DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) light microscope connected to a Leica Microsystems DFC-300-FX digital camera (Leica Microsystems, Germany). Observations were made in the whole biopsy looking for a comparison between grafted and the native bone which allowed the distinction of three areas: (1) area comprising the pre-existing residual bone (e.g. residual maxillary bone), (2) area comprising the interface between the grafted bone and the host bone, and (3) area comprising the still un-

remodeled area of the graft bone. The delineation of the un-remodeled bone was made based in histological criteria, e.g. absence of nucleus in osteocytes lacunae and local absence of capillaries.

Mini-implants biopsies retrieval and evaluation

Still at the second surgical phase, at the periphery of the grafted block, a mini-implant, with acid-etched surface (2.0 mm in diameter and 5.5 mm long - Neodent, Curitiba, Brazil) was installed. **Figure 1** shows the region where the bone biopsy was retrieved and the installed mini-implant. It is important to state that, in cases in which the placement of a mini-implant could be harmful to the regular implants placed (i.e. cases in which only one bone graft block was used, and that the implant was using the majority of the grafted area), this part of the methodology was not performed. Thus, twelve mini-implants were placed in AL-treated group, and 8 in AT-treated group.

These mini-implants, as well as a small amount of bone surrounding them, were retrieved at the moment those surgical sites were re-opened for healing abutments installation, using a 3 mm internal diameter trephine bur (**Figure 2**). These biopsies were processed using a system in which no decalcification is necessary, preserving the implant during the histological preparation, and the section were stained using Toluidine blue.⁵⁶

Histomorphometric analysis of these samples was conducted to assess the quantity of bone formed around the mini-implant threads, after the traditional osseointegration healing time (6 months for maxilla and 4 months for mandible). Images of the central section of the implant were acquired using a DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) light microscope connected to a

Leica Microsystems DFC-300-FX digital camera (Leica Microsystems, Germany), and using a 100x magnification.

Two parameters were measured: the bone-to-implant contact (BIC) and the bone area between the threads of the mini-implant (BA), and they were expressed as percentages. Three distinct regions were measured bilaterally for each mini-implant, representatively to the “superficial” – (R1), “medial” – (R2) and “profound” – (R3) regions of the mini-implant, corresponding to threads 1-2, 7-8 and 13-14, respectively. Measured values were also combined to express a general value for each mini-implant.

Descriptive analysis of obtained data was expressed as means and standard deviations. Commercially available software (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) was utilized to compare the evaluated parameters means and draw the graphics. Data was subjected to normality test analysis (Kolgomorov-Smirnov test), and for both evaluated parameters data were normally distributed. Thus ANOVA followed by Tukey post test was used for multiple comparisons, and t-test was used for paired comparisons. Statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

For both treated groups, the selected methodology to attain bone anatomy compatible to implants placement was successful, since the surgical approach used in this study allowed implant placement in all treated cases. During the post-operative period, one block graft became exposed (30 days after surgery) and four grafts were lost in the AL group (the grafted region still presented

inflammation signs 60 days after surgery, and using a surgical approach it was seen that the fixation screw of the grafts was loosened).

The qualitative microscopic analysis of the bone biopsies retrieved from the AL group showed variable-sized segments of necrotic bone, with empty osteocytes lacunae in the internal region of the grafted block. Signs of biocompatibility were seen, without the presence of inflammatory cells, allied to the fact that the focuses of necrotic bone were always surrounded by newly-formed living bone, rich in osteoblasts. The separation between the residual bone and the grafted material was not very well delimited, and the interfaces between the newly-formed bone and the necrotic material could be seen in several regions inside the blocks, with a tendency to a higher amount of necrotic bone in the outer part of the grafted biopsies (distant from the host berth). Sections exemplifying these results can be seen in **Figures 3 and 4**.

In AT group, only small areas of necrotic bone could be seen in the full biopsy (as seen on **Figure 5 A**), with the presence of newly-formed bone and cellularized tissue, rich in osteocytes even in the outer limits of the grafted region (**Figure 5 B**). Reversion lines, indicating an advanced stage of remodeling of these grafts, with almost no perception of difference between the grafted and the host bone, were also present.

Quantitative histomorphometric analysis was made based on sections with an average width of 37 μm , which were able to show the relationship between the newly-formed bone and the implant surface (**Figures 6 and 7**). For all studied regions (R1, R2 and R3), and also for the mini-implant considered in its totality, no significant difference between the studied groups were found for both BIC and BA. The largest difference between the groups, considering the averages, were

seen when BIC was evaluated in R2 ($41.9 \pm 32.2\%$ for AL-treated group against $59.3 \pm 24.5\%$ for AT) and R3 ($42.0 \pm 31.6\%$ for AL-treated group against $57.7 \pm 36.1\%$ for AT), and when BA was evaluated in R2 ($39.2 \pm 32.1\%$ for AL-treated group against $58.7 \pm 22.4\%$ for AT), although without any statistical significance. These results are expressed in **Table 1** and **Figures 8 and 9**.

Discussion

Although there is an progressively higher number of papers in literature regarding the use of fresh-frozen bone allografts (AL)⁵⁷⁻⁵⁹ scientific evidence on their biological behavior is still unsatisfactory and divisive. While some studies report that AL grafts may provide results equivalent to those achieved with autologous bone grafts^{24, 60, 61}, there are others concentrating on worse biological performance (higher resorption rates⁶², slower biological incorporation⁶³ and worse long-term survival rates of subsequently inserted implants^{24, 53}) when compared to AT grafts.

Literature considers that the long-term implant survival rates for implants installed in grafted bone areas is generally not as good as for the non-grafted regions, even when the use of the gold standard material for grafting – autologous bone – is used.⁵⁵ So far, little information regarding this topic in areas grafted with fresh-frozen bone allografts, a plausible substitute material for autografts, is present in literature. Bone quality, a host-related factor, is believed to be one of the most important predictors of outcome and in grafted jaws has particular relevance, since it can directly interfere in the quality of the osseointegration of the implants, and therefore in their longitudinal success.⁶⁴

In this study, bone quality was assessed in two different moments: at the moments implants were installed and after the traditional osseointegration period, to better understand the mechanisms that might lead to an impaired osseointegration in grafted areas.

In literature, one of the causes associated to the poorer results regarding implants osseointegration success in grafted areas regards the slow remodeling and revitalization of block grafts.^{65, 66} This information is especially important when referring to AL grafts, since it is already well established that the processing of allograft tissue, even if only antibiotic-washing and deep-freezing are used, significantly weakens the biologic and mechanical properties initially present in the bone tissue.^{23, 67} Our results showed variable-sized segments of necrotic bone, with empty osteocytes lacunae in the internal region of the grafted AL blocks, while only small areas of necrotic bone could be seen in the AT group biopsies, with the presence of newly-formed bone and only small spots of necrotic material, according to what is stated in literature.²⁵ These results are also similar to what was previously reported by our study group, although the cortico-cancellous AL bone used in this study has an apparent better biological performance when compared to the cortical AL grafts used in our previous study, with a diminished amount of necrotic bone at the moment the implants were installed.⁶³ The fact that the separation between the residual bone and the grafted material was not very well delimited, also corroborates this fact, since when cortical AL block were used, the interface between the necrotic part of the grafted block and the host bone was still macroscopically visible, seven months after grafting.⁶³

There are other papers in literature that go in the same direction of our results, regarding topics such as inadequate revascularization, little creeping attachment and decreased mineral accretion associated to a small number of cells working in the remodeling process of the fresh-frozen bone allografts, acting only as an osteoconductive biomaterial, without any osteogenic or osteoinductive properties, generally concluding that AL grafts perform histologically and biologically poorly when compared to AT grafts, mainly considering the first 12 months following the bone-graft surgery^{7-9, 23, 68}

It is important to the state that this delayed remodeling of AL grafts could have direct implications over its clinical use, since it could compromise the osseointegration of implants installed in the grafted area. The histomorphometric evaluation developed in this study aimed to attain information on this subject, checking the quality of the osseointegration achieved in the grafted areas. In our study, although there was a biological delay in AL grafts remodeling process compared to AT, no significant difference between the studied groups was found for both BIC and BA, for all studied regions (R1, R2 and R3), and for the mini-implant considered in its totality. These results, based on an evaluation method which is able to provide reliable data on the strength of the interface and the quality of implant anchorage in periimplant bone, show that both tested materials promoted the osseointegration of the implants in terms of success, since the achieved values are within those accepted in literature as characteristic of a consolidated osseointegration process.^{69, 70}

Nevertheless, if we put together information on the slower remodeling of AL grafts compared to AT⁶³ and the lower long-term implant survival rates for implants installed in grafted bone areas⁵⁵, it becomes clear that results such as

those showed by Carinci et al.⁵³, with a low long-term implants success rate in AL grafted areas, might be biologically ratified. In our study, the largest difference between AL and AT groups, regarding R2 and R3 for BIC and R2 for BA, although without statistical significance, reveal that the effects of these biological events into the long-term clinical results of fresh-frozen bone allografts in maxillary bones, and the success rate of implants and implant-supported prosthesis installed over them need further investigation.

CONCLUSION

Considering these results and based on the limitations of the evaluation model that was used, it is concluded that AL showed a poorer biological performance compared to AT, based on its slower remodeling process, although the short-term evaluation of osseointegration parameters showed similar results considering areas augmented with both materials.

Acknowledgements

This study was financed by the Brazilian agencies Fapesp (2008/09207-9), CAPES (0050/10-5) and CNPq (scholarship).

References

1. Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y, Tsuru H. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study. *J Prosthet Dent* 1992; **68**: 813-816.
2. Sahin S, Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. II: A morphometric evaluation after three months of loading. *J Prosthet Dent* 1996; **76**: 176-180.

3. Wadamoto M, Akagawa Y, Sato Y, Kubo T. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. I: A morphometric evaluation in initial healing. *J Prosthet Dent* 1996; **76**: 170-175.
4. Renouard F, Nisand D. Impact of implant length and diameter on survival rates. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17 Suppl 2**: 35-51.
5. Wiens JP. The use of osseointegrated implants in the treatment of patients with trauma. *J Prosthet Dent* 1992; **67**: 670-678.
6. Barber HD, Betts NJ. Rehabilitation of maxillofacial trauma patients with dental implants. *Implant Dent* 1993; **2**: 191-193.
7. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987: 7-16.
8. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty* 1993; **4**: 58-63.
9. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics* 1994; **17**: 809-810, 821.
10. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17 Suppl 2**: 136-159.
11. Contar CM, Sarot JR, Bordini J, Jr., Galvao GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**: 1280-1285.
12. Ladd AL, Pliam NB. Use of bone-graft substitutes in distal radius fractures. *J Am Acad Orthop Surg* 1999; **7**: 279-290.
13. Catone GA, Reimer BL, McNeir D, Ray R. Tibial autogenous cancellous bone as an alternative donor site in maxillofacial surgery: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; **50**: 1258-1263.
14. Donovan MG, Dickerson NC, Hanson LJ, Gustafson RB. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; **52**: 588-594.
15. Donovan MG, Dickerson NC, Mitchell JC. Calvarial bone harvest and grafting techniques for maxillary and mandibular implant surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 1994; **2**: 109-122.
16. Keller EE, Triplett WW. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1987; **45**: 11-14.

17. Capelli M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; **23**: 277-285.
18. Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent* 1995; **4**: 261-267.
19. Nowzari H, Aalam AA. Mandibular cortical bone graft part 2: surgical technique, applications, and morbidity. *Compend Contin Educ Dent* 2007; **28**: 274-280; quiz 281-272.
20. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 28-42.
21. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; **18**: 187-196.
22. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics* 2004; **27**: 488-495; quiz 496-487.
23. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent* 2003; **12**: 217-226.
24. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; **25**: 525-531.
25. Zerbo IR, de Lange GL, Joldersma M, Bronckers AL, Burger EH. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2003; **14**: 759-766.
26. Collins M, James DR, Mars M. Alveolar bone grafting: a review of 115 patients. *Eur J Orthod* 1998; **20**: 115-120.
27. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998; **9**: 151-162.
28. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 292-298.
29. Lee DW, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Kim TI. Bone regeneration effects of human allogeneous bone substitutes: a preliminary study. *J Periodontal Implant Sci* 2010; **40**: 132-138.

30. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005; **16**: 981-989.
31. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 15-21.
32. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999; **81**: 333-335.
33. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 69-86.
34. American Association of Tissue Banks. 16th Annual meeting. August 24-26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993; **33**: 610-621.
35. Bui MM, Smith P, Agresta SV, Cheong D, Letson GD. Practical issues of intraoperative frozen section diagnosis of bone and soft tissue lesions. *Cancer Control* 2008; **15**: 7-12.
36. Aguirre Herrera P, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Chile. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 153-156.
37. Barcena A, Kapidzic M, Muench MO, Gormley M, Scott MA, Weier JF, Ferlatte C, Fisher SJ. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. *Dev Biol* 2009; **327**: 24-33.
38. Gamero EC, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Peru. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 167-171.
39. Hilmy N, Manjas M, Ferdiansyah, Abbas B, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Indonesia. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 103-107.
40. Kang YK, Yim CJ, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Korea. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 109-113.
41. Lobo Gajiwala A, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in India. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 93-101.

42. Martinez-Pardo ME, Morales Pedraza J, Sanchez Ramirez O. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Mexico. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 157-165.
43. Morales Pedraza J, Phillips GO. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Asia and the Pacific and the Latin American regions. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 79-86.
44. Yusof N, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Malaysia. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 115-117.
45. Morales Pedraza J, Phillips GO. The evolution and impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Asia and the Pacific region. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 87-91.
46. Morales Pedraza J, Sanchez Noda EO, Rodriguez Cardona RL, Otero I. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Cuba. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 149-152.
47. Nather A, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Singapore. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 119-124.
48. Vajaradul Y, Morales Pedraza J. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) program on radiation and tissue banking in Thailand. *Cell Tissue Bank* 2009; **10**: 125-132.
49. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989; **24**: 891-905.
50. Spin-Neto R, Coletti FL, Pereira LAVD, Marcantonio E, Marcantonio E, Jr. Is peripheral blood-cell balance altered by the use of fresh frozen bone block allografts in lateral maxillary ridge augmentation? *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; **In Press**.
51. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 1982; **64**: 270-279.
52. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990; **14**: 243-248.

53. Carinci F, Brunelli G, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmenger L. A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010; **12**: 91-98.
54. Bach DE, Burgess LP, Zislis T, Quigley N, Hollinger JO. Cranial, iliac, and demineralized freeze-dried bone grafts of the mandible in dogs. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; **117**: 390-395.
55. Rasmusson L, Thor A, Sennerby L. Stability Evaluation of Implants Integrated in Grafted and Nongrafted Maxillary Bone: A Clinical Study from Implant Placement to Abutment Connection. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; **Epub ahead of print**.
56. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; **11**: 318-326.
57. Bridwell KH, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C, Blanke K. Posterior spinal fusion supplemented with only allograft bone in paralytic scoliosis. Does it work? *Spine (Phila Pa 1976)* 1994; **19**: 2658-2666.
58. Carter G. Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J* 1999; **70**: 660-670; quiz 672-666.
59. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; **36 Suppl 3**: S20-27.
60. Carinci F, Brunelli G, Zollino I, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmenger L. Mandibles grafted with fresh-frozen bone: an evaluation of implant outcome. *Implant Dent* 2009; **18**: 86-95.
61. Carinci F, Guidi R, Franco M, Viscioni A, Rigo L, De Santis B, Tropina E. Implants inserted in fresh-frozen bone: a retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence Int* 2009; **40**: 413-419.
62. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Violin LAVD, Marcantonio Jr. E, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res* 2011; **In Press**.
63. Spin-Neto R, Del Barrio RAL, Violin LAVD, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio Jr. E. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; **In Press**.

64. Branemark PI, Svensson B, van Steenberghe D. Ten-year survival rates of fixed prostheses on four or six implants ad modum Branemark in full edentulism. *Clin Oral Implants Res* 1995; **6**: 227-231.
65. Rasmusson L, Meredith N, Kahnberg KE, Sennerby L. Effects of barrier membranes on bone resorption and implant stability in onlay bone grafts. An experimental study. *Clin Oral Implants Res* 1999; **10**: 267-277.
66. Rasmusson L, Stegersjo G, Kahnberg KE, Sennerby L. Implant stability measurements using resonance frequency analysis in the grafted maxilla: a cross-sectional pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res* 1999; **1**: 70-74.
67. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993; **13**: 29-45.
68. Ito H, Koefoed M, Tiyyapatanaputi P, Gromov K, Goater JJ, Carmouche J, Zhang X, Rubery PT, Rabinowitz J, Samulski RJ, Nakamura T, Soballe K, O'Keefe RJ, Boyce BF, Schwarz EM. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat Med* 2005; **11**: 291-297.
69. Park IP, Kim SK, Lee SJ, Lee JH. The relationship between initial implant stability quotient values and bone-to-implant contact ratio in the rabbit tibia. *J Adv Prosthodont* 2011; **3**: 76-80.
70. Szmukler-Moncler S, Piattelli A, Favero GA, Dubruille JH. Considerations preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. *Clin Oral Implants Res* 2000; **11**: 12-25.

Figures

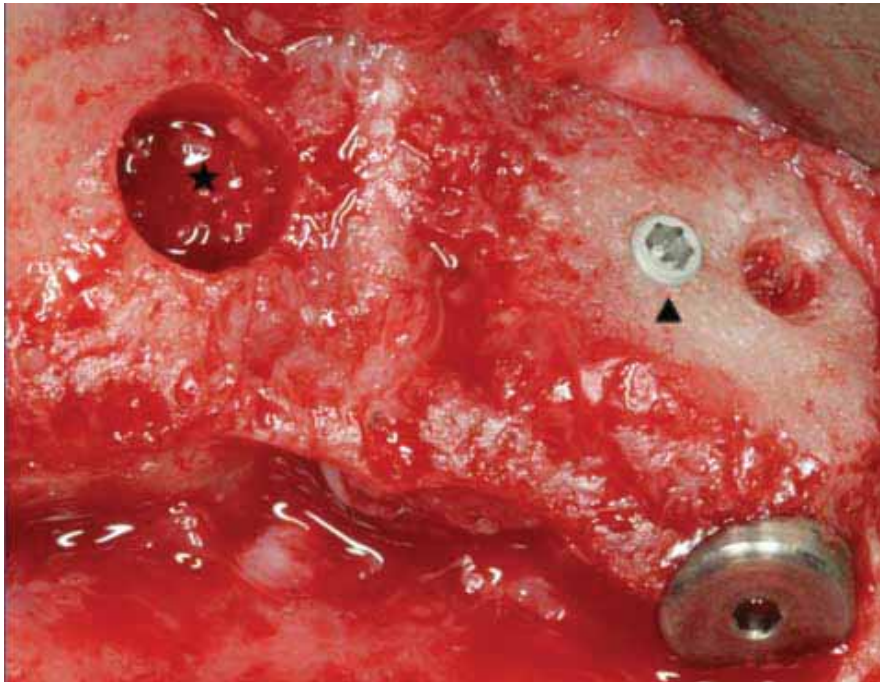


Figure 1 – Clinical example of a grafted area, showing the regions where the bone biopsy was retrieved (*) and where the mini-implant was placed (Δ).

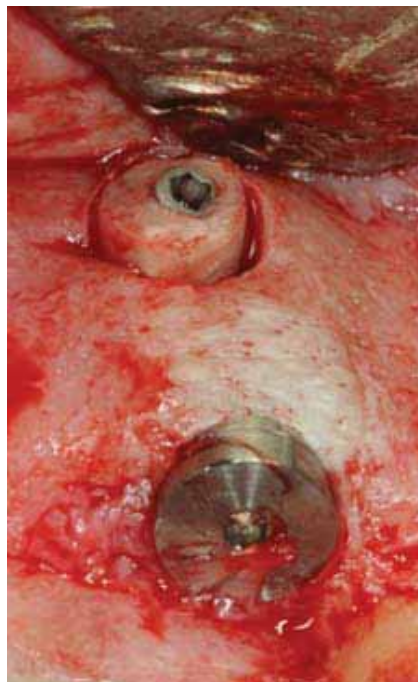


Figure 2 – Retrieval of the biopsy containing the mini-implant.

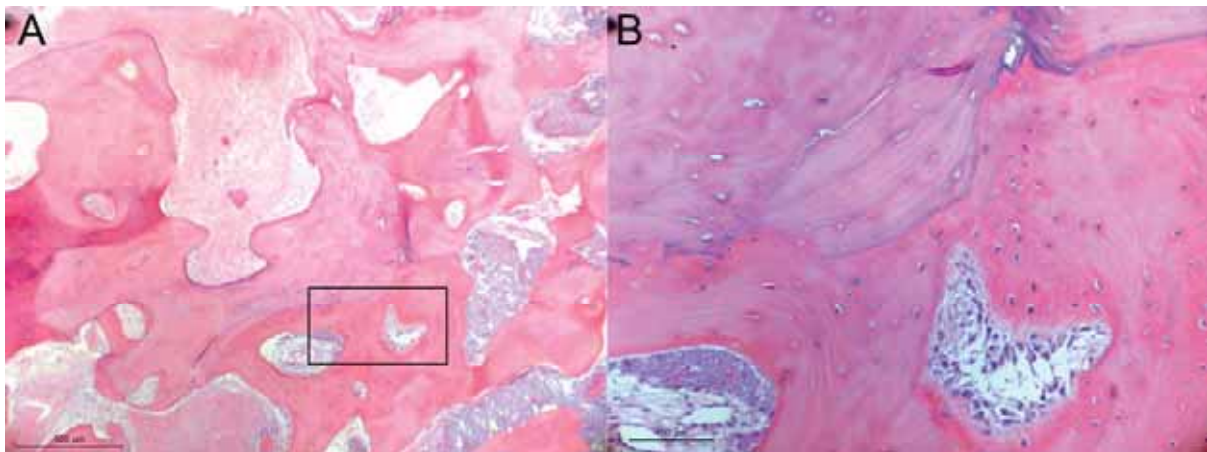


Figure 3 – Photomicrograph of a biopsy retrieved from the AL treated group. (A) shows areas of necrotic bone in direct contact with viable, newly-formed, bone. In (B), a higher magnification (of the area corresponding to the rectangle), showing the necrotic bone (with empty osteocytes lacunae) surrounded by viable tissue, with exuberant osteocytes.

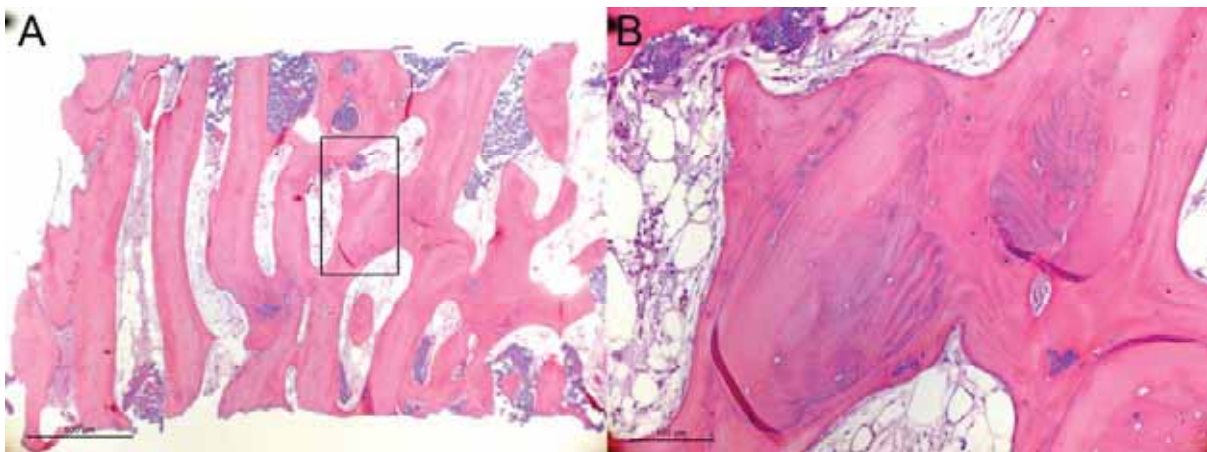


Figure 4 – Photomicrograph of a biopsy retrieved from the AL treated group. (A) shows a general overview of the grafted area, in which is difficult to differentiate the new-formed bone and the necrotic material. In (B), a higher magnification (of the area corresponding to the rectangle), shows the direct contact between the viable bone and the reminiscent necrotic material.

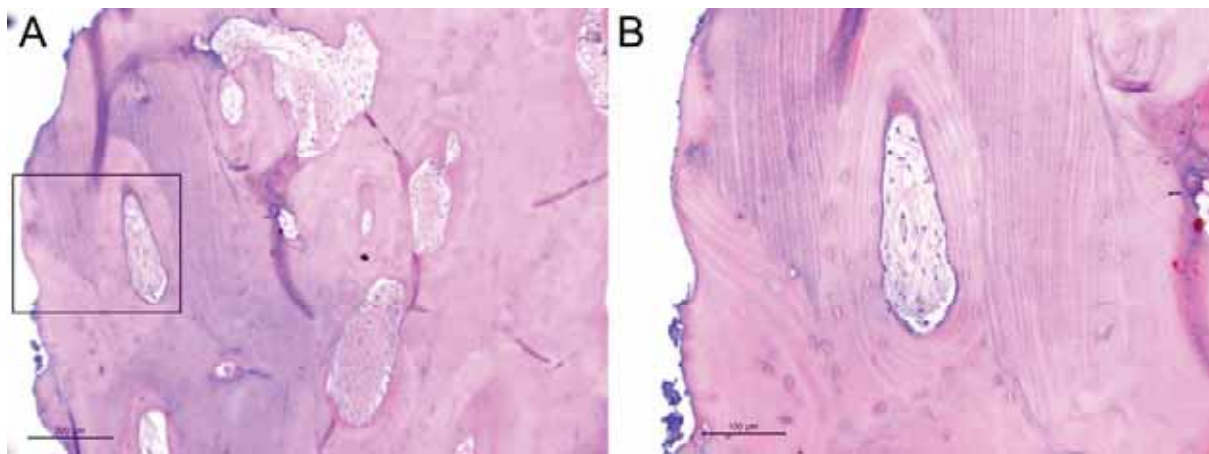


Figure 5 – Photomicrograph of a biopsy retrieved from the AT treated group. (A) shows a general overview of the grafted area, mainly penetrated by living cells, with small areas of necrotic bone. In (B), a higher magnification (of the area corresponding to the rectangle), shows the presence of newly-formed bone and cellularized tissue, rich in osteocytes, even in the outer limits of the grafted region.

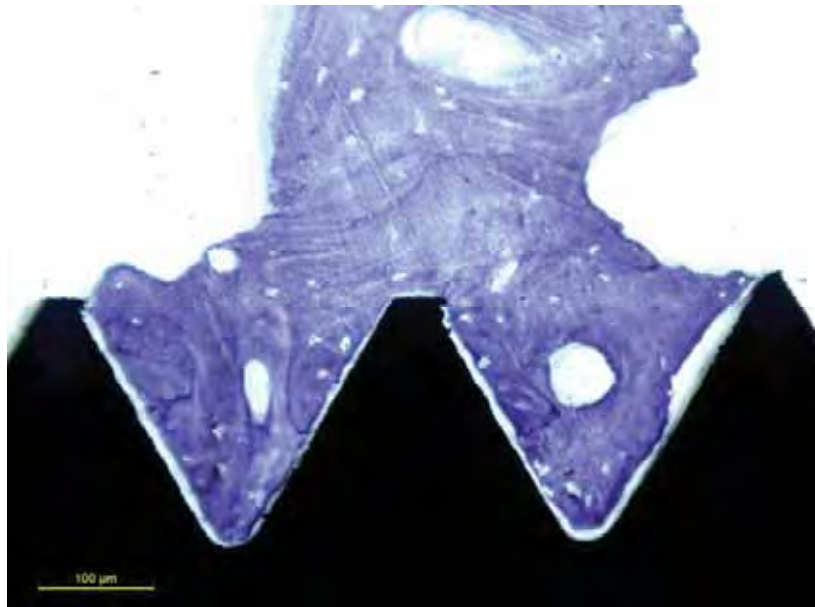


Figure 6 – Photomicrograph of a mini-implant biopsy retrieved from the AL treated group, stained in Toluidine blue, and used for the histomorphometric evaluation.

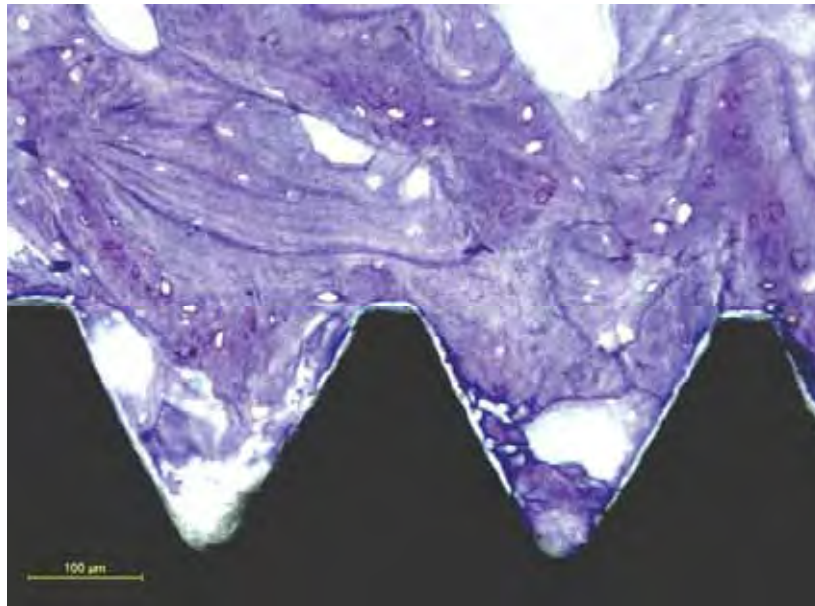


Figure 7 – Photomicrograph of a mini-implant biopsy retrieved from the AT treated group, stained in Toluidine blue, and used for the histomorphometric evaluation.

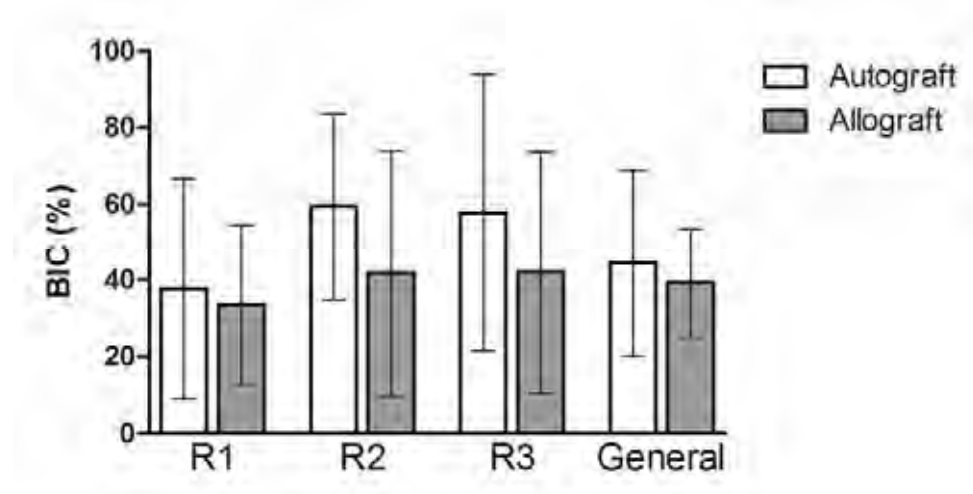


Figure 8 – Bone-to-implant contact (BIC), in %. The results were expressed in means and standard deviations.

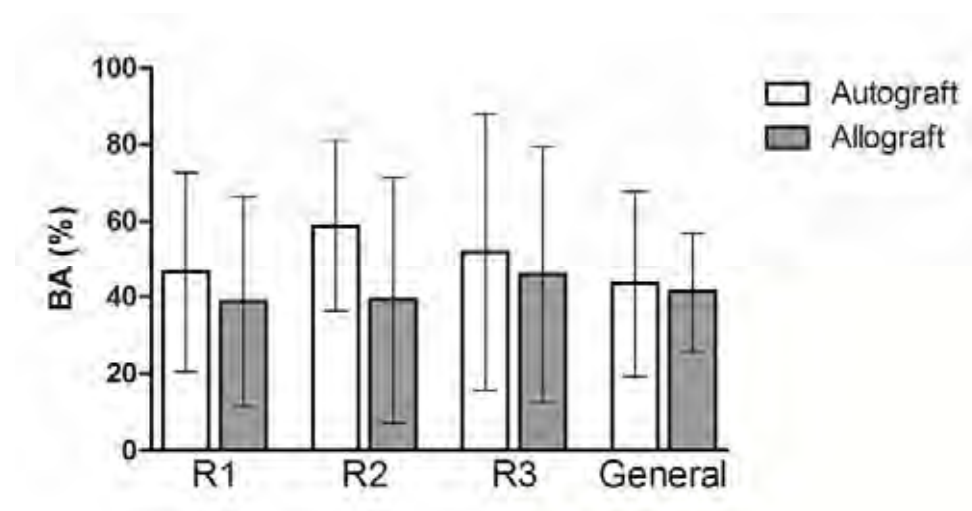


Figure 9 – Bone area between the threads of the implant (BA), in %. The results were expressed in means and standard deviations.

Table 1 – Bone-to-implant contact (BIC) and bone area between the threads (BA), expressed in means and standard deviations, in three distinct regions around the mini-implant (“superficial” – R1, “medial” – R2 and “profound” – R3) and in general

<i>Parameter</i>	<i>R1</i>		<i>R2</i>		<i>R3</i>		<i>General</i>	
	<i>AL</i>	<i>AT</i>	<i>AL</i>	<i>AT</i>	<i>AL</i>	<i>AT</i>	<i>AL</i>	<i>AT</i>
<i>BIC (%)</i>	33.6±20.8	37.8±28.9	41.9±32.2	59.3±24.4	42.0±31.6	57.7±36.1	39.2±14.3	44.4±24.4
<i>BA (%)</i>	39.0±27.3	46.5±26.0	39.2±32.1	58.7±22.4	45.9±33.3	51.9±36.2	41.4±15.6	43.5±24.3

Incorporação de enxertos ósseos autógenos e homólogos em humanos: abordagem tomográfica

Incorporation of autologous and homologous bone grafts in humans: a tomographic approach

Rubens Spin-Neto*
Luis Antonio Violin Pereira**
Elcio Marcantonio***
Rosemary Adriana C. Marcantonio****
Elcio Marcantonio Jr*****

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação de enxertos ósseos em bloco, autógenos corticais e homólogos (córtico-medulares) em humanos, através de avaliação tomográfica. Para tal, tomografias de dez pacientes (cinco tratados com enxertos ósseos homólogos e cinco com enxertos ósseos autógenos), obtidas previamente a cirurgia de enxerto, aos 14 e aos 180 dias pós-operatórios, foram avaliadas em relação à espessura, altura e densidade ósseas, em um total de 19 blocos ósseos avaliados, sendo dez homólogos e nove autólogos. Através de análises estatísticas, os resultados demonstraram similaridade entre a espessura e a densidade óssea obtida nos grupos tratados com enxerto ósseo autógeno e homólogo. Pode-se concluir que o enxerto de osso homólogo apresentou, sob um ponto de vista tomográfico e 180 dias de seguimento, características semelhantes ao enxerto ósseo autógeno, tendo proporcionado e mantido um aumento de espessura capaz de permitir a reabilitação com implantes osseointegráveis.

Unitermos - Enxerto ósseo; Transplante homólogo; Transplante autógeno; Avaliação tomográfica.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the remodeling of autologous and homologous bone grafts in humans, using tomographic images. For this, CT images from 10 patients (5 treated with autologous bone grafts and 5 treated with homologous bone grafts), made previously to the grafting procedures, and 14 and 180 days post-operative were evaluated regarding to bone height, width, and density, in a total of 19 bone blocks, 10 homologous and 9 autologous. Results showed similarities between the two tested materials regarding bone width and density. It can be concluded that the homologous bone presented, in a tomographic approach, after 180 days of follow-up, characteristics which can corroborate its use as a bone graft material, providing and sustaining a good bone volume for oral rehabilitation with dental implants.

Key Words - Bone graft; Homologous transplantation; Autologous transplantation; Tomographic evaluation.

* Doutorando e mestre em Periodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp.

** Professor associado do Departamento de Histologia e Embriologia - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

*** Professor titular aposentado do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Cirurgia bucomaxilofacial - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp.

**** Professora adjunta do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp.

***** Professor titular do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp.

Introdução

O uso de enxertia óssea em bloco, no intuito de se obter um rebordo ósseo viável para a instalação de implantes de titânio, aumentou de forma significativa na última década, em conjunto com o uso de novos biomateriais e técnicas para a realização de tal procedimento¹⁻³. Neste ínterim, o enxerto ósseo autógeno se mantém como o método mais previsível e melhor documentado, sendo, portanto, considerado o método padrão para correção deste tipo de defeito⁴. O grande problema, porém, é que tal enxerto ósseo, além de associado com morbidade, dor e perda de função temporária, também fornece quantidade óssea limitada, de acordo com a anatomia da região doadora, além da necessidade da criação de uma área cirúrgica adicional⁵.

Apesar de haver uma grande variedade de biomateriais para implantes ósseos disponíveis no mercado, fator associado a um avanço crescente no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos mesmos, ainda não existe um biomaterial que traga todas as qualidades, porém sem as limitações do osso autógeno, e esse é o principal fator que movimenta a busca por novos biomateriais.

O uso de tecido ósseo proveniente de bancos de tecidos, também conhecido como enxerto homogêneo ou fresco congelado, tem aumentado nos últimos anos. A indicação deste tipo de biomaterial ocorre quando há ausência de osso autógeno para captação, ou em casos quando o paciente apresenta resistência frente à necessidade de manipulação de um segundo leito cirúrgico para captação do enxerto, atividade esta frequentemente associada a problemas na fase pós-operatória, tais como deiscência de sutura, dor e infecção⁵.

Vantagens como facilidade de obtenção, em quantidade desejada, redução do tempo cirúrgico e a não necessidade da manipulação de uma segunda área cirúrgica tornam o osso homogêneo, captado junto aos bancos de tecido, uma alternativa viável nas cirurgias de reconstrução óssea prévias a reabilitação com implantes osseointegráveis⁶. Acredita-se que este enxerto ósseo atue como um arcabouço para a neoformação óssea, agindo preferencialmente como osteocondutor e, talvez, como osteoindutor⁷.

Estudos prévios sugerem que, quando comparado ao enxerto autógeno, o enxerto homogêneo apresenta capacidade de revascularização e remodelação mais lentas e a união entre o leito receptor e o enxerto pode ser obtida de forma consistente, porém não uniforme⁸. A maior demanda de tempo necessário para remodelação, a necessidade de respeito absoluto aos protocolos de captação e processamento, para que não ocorra contaminação, e o fator psicológico de se utilizar um material obtido de cadáveres seriam as desvantagens deste tipo de enxerto enfocadas na literatura⁹. Adicionalmente, poucos estudos na área de Implantodontia, utilizando grupo controle, análise tomográfica e histológica,

tratamento estatístico dos dados, seguimento à longo prazo, têm sido conduzidos no intuito de se comparar o enxerto ósseo homogêneo ao padrão ouro atualmente disponível: o enxerto ósseo autógeno.

Apesar do fato de que em 2002, no Brasil, a portaria nº 1.686 do Ministério da Saúde ter aprovado as normas para autorização de funcionamento e cadastramento de bancos de tecidos musculoesqueléticos, ainda é pequeno o número de bancos de tecido musculoesquelético já em funcionamento e de grupos de pesquisa enfocados em esclarecer como ocorre a remodelação deste enxerto e se há, parcial ou totalmente, substituição deste enxerto por tecido ósseo vital¹⁰.

Em relação a como avaliar o desempenho destes enxertos e a despeito do fato das tomografias estarem se tornando o exame diagnóstico preferencial no planejamento de implantes e enxertos, os estudos que enfoquem a incorporação óssea pós-enxertia por meio tomográfico também são poucos. Principalmente, em relação às alterações na espessura e densidade ósseas pós-enxertia, os exames radiográficos panorâmicos pouco auxiliam o clínico na tomada de decisões, porém, isto não influenciou no fato de que até o momento a maioria dos estudos disponíveis neste foco fossem feitos com estes exames para ratificar seus resultados¹¹⁻¹².

Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar a incorporação de enxertos ósseos autógenos (corticais) e homogêneos (córtico-medulares) em humanos, através de avaliação tomográfica, com foco principal nas alterações na espessura e densidade ósseas, que seguem os procedimentos de enxertia.

Material e Método

Composição da amostra

Neste estudo foram avaliadas tomografias obtidas de dez pacientes, edêntulos parciais ou totais, de ambos os sexos e idade variando entre os 22 e 65 anos, atendidos nos cursos de Especialização em Implantodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Foar-Unesp), que buscavam reabilitação oral por meio de implantes osseointegráveis, porém, apresentavam defeitos ósseos maxilofaciais que impossibilitavam a instalação imediata desses implantes; necessitando, portanto, de enxertia óssea.

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp (CEP-FO/CAR) – e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (Conep-MS) e aprovado sob o protocolo número 36/08, sendo que todos os pacientes participantes do projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido ratificando sua participação no estudo. Os dez pacientes foram divididos em dois grupos de cinco pacientes cada; sendo que cinco pacientes receberam enxertos ósseos autógenos e os outros cinco enxertos ósseos homogêneos, obtidos junto ao banco

de tecidos musculoesqueléticos da UniOss (Marília, Brasil), banco este reconhecido e de funcionamento autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Ao todo foram avaliados dez blocos ósseos homogêneos e nove blocos ósseos autógenos, visto que cada paciente recebeu mais de um bloco ósseo em todos os casos incluídos na pesquisa. A alocação dos pacientes em cada um dos grupos não foi randômica por preceitos éticos. Eticamente, o paciente tratado com osso homogêneo deve ser informado e consentir sobre o fato. Além disto, como atualmente o osso autógeno é tido como padrão ouro, só foram tratados com osso homogêneo pacientes que não possuíam osso autógeno em quantidade suficiente para enxertia ou aqueles pacientes que apresentavam grande resistência em relação a abertura de uma segunda área cirúrgica para remoção de seu próprio osso.

Procedimentos cirúrgicos

Para realização dos enxertos ósseos, após a antisepsia extra e intraoral do campo operatório, foi realizado o bloqueio anestésico da região correspondente à inervação da área a ser enxertada e nos casos de enxertia autógena, também, da área doadora (neste caso, a linha oblíqua externa da mandíbula). O procedimento para retirada e instalação dos enxertos seguiu o protocolo clássico já descrito na literatura¹³. Resumidamente, o procedimento foi iniciado com uma incisão sobre o rebordo, na região edêntula, seguida de incisões relaxantes. Foi deslocado um retalho mucoperiosteal que expôs o leito receptor, permitindo plena visualização do defeito ósseo a ser reparado. Incisões sob o periosteo do retalho foram realizadas a fim de diminuir a tensão tecidual e, conseqüentemente, permitir o recobrimento do enxerto ósseo a ser instalado. Nos casos tratados com osso autógeno, a área doadora foi então abordada, com a exposição do leito ósseo e seu preparo, sob irrigação abundante, com o uso de fresas cilíndricas # 700 e # 701, e de delicados cinzéis, para

remoção do bloco ósseo, que foi trabalhado para permitir sua fixação ao leito com parafuso de titânio de 1,5 mm de diâmetro. Bordas irregulares que pudessem lacerar o retalho e, conseqüentemente, expor o enxerto foram removidas com brocas esféricas e sob irrigação constante e as sobras ósseas, obtidas durante o remodelamento dos blocos foram adaptadas ao redor dos blocos. Uma membrana reabsorvível de colágeno bovino (Genius-Baumer, Brasil) foi utilizada no recobrimento dos enxertos, no intuito de impedir a colonização de fibroblastos nesta área, visto que o periosteo, encarregado desta função, encontrava-se desorganizado devido ao deslocamento do retalho. A primeira fase cirúrgica foi finalizada com o reposicionamento do retalho sobre a área receptora e sutura simples interrompida, usando fio não reabsorvível (Nylon 4-0, Ethicon). A área doadora também foi suturada com sutura simples interrompida, usando fio não reabsorvível (Seda 4-0, Ethicon).

No grupo tratado com osso homogêneo, blocos de tecido ósseo córtico-medular, obtidos do banco de tecidos UniOss, foram utilizados como biomaterial para enxertia, sendo que após retirados da embalagem, foram colocados por cinco minutos em solução salina estéril para reidratação e retorno à temperatura ambiente, para seu posterior ajuste e corte e adaptação de maneira perfeita ao leito receptor. Adicionalmente, a região medular destes enxertos foi compactada utilizando-se um alicate biarticulado, de tal modo a diminuir os espaços vazios entre as trabéculas ósseas existentes no enxerto; no intuito de se aumentar sua previsibilidade volumétrica e também de aumentar seu ajuste ao leito receptor.

Os pacientes também receberam orientações pós-operatórias, incluindo a prescrição de medicação sistêmica constituída por antibiótico (amoxicilina 500 mg, três vezes ao dia, durante sete dias), anti-inflamatório (nimesulida 100 mg, duas vezes ao dia, durante cinco dias), analgésico (paracetamol 750 mg, quatro vezes ao dia, se houvesse dor)



Figura 1

Guia tomográfico, feito em resina acrílica convencional, utilizado na pesquisa. Atentar para as marcações circulares preenchidas com guta-percha.

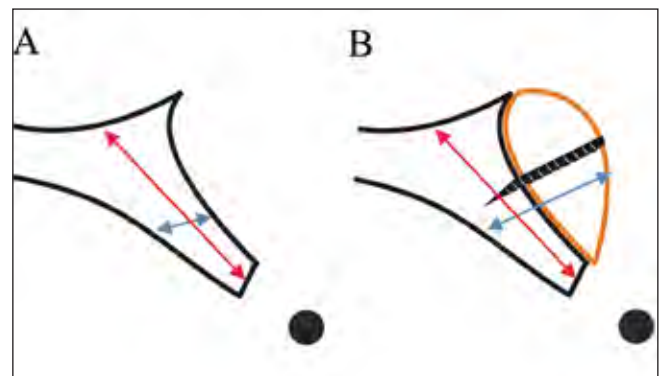


Figura 2

Diagrama evidenciando como foram feitas as medidas de altura (vermelho) e espessura (azul) ósseas na tomografia. O diagrama A mostra um perfil transversal prévio à enxertia, enquanto que o diagrama B mostra o perfil transversal conforme visto aos 14 e 180 dias pós-operatórios. A densidade óssea foi medida sobre a mesma linha utilizada para medida da espessura.

e medicação tópica constituída por enxágue de digluconato de clorexidina a 0,12%. A sutura foi removida após 14 dias e a região operada permaneceu sem influência de carga direta durante toda a fase de cicatrização óssea. Para os pacientes usuários de prótese removível, parcial ou total, foi feito um alívio e reembasamento dessts próteses com material resiliente (Truesoft, Bosworth, EUA), permitindo que os mesmos usassem socialmente suas próteses, porém, sem trazer danos à região enxertada.

Avaliação tomográfica

A avaliação tomográfica foi baseada no uso de um tomógrafo do tipo cone-beam I-CAT Classic (Hartfield, PA, USA), onde a imagem da região de interesse foi reconstruída em um raio de 360 graus, com um tamanho mínimo de voxel de 0,25 mm, em uma escala de cinza de 14 *bits*. O tamanho de cada pixel é de 0,125 mm, com espessura de corte mínima de 0,25 mm, aumentando a precisão das medidas que foram feitas sobre estas imagens¹⁴.

Tais exames foram realizados em três momentos diferentes, para todos os pacientes: sete dias antes da realização dos enxertos (evidenciando a real necessidade do mesmo), 14 dias após a realização do enxerto ósseo (permitindo a avaliação pós-cirúrgica imediata do ganho de tecido proporcionado pelo procedimento) e sete dias antes da instalação dos implantes – ou seis meses após a instalação dos enxertos – (permitindo a avaliação da real quantia de tecido ósseo aumentado e o planejamento para instalação dos implantes); sendo que em todos os exames um guia tomográfico foi utilizado. Estes guias (Figura 1), feitos com resina acrílica, possuem marcações radiopacas com 1 mm de diâmetro nas posições onde se esperava que os implantes fossem instalados, ou ainda, nas posições onde os blocos ósseos foram enxertados, permitindo desta forma que as medidas pudessem ser feitas na mesma posição em cada uma das imagens tomográficas feitas, garantindo a sua padronização.

A partir das tomografias, informações sobre a densidade, altura e a espessura óssea na região de realização dos enxertos foram obtidas (Figura 2), utilizando-se o *software* Dental Slice 2.7.2 (Bioparts, Brasil) e a correlação destes valores nos três momentos observados foi avaliada, bem como o percentual de ganho ou perda tecidual em cada momento observado¹⁴⁻¹⁵.

Obtenção dos resultados e análise estatística

Todos os resultados referentes à análise tomográfica foram agrupados em tabelas e encaminhados para avaliação estatística, específica para cada um dos dados obtidos, de forma a permitir a avaliação intra e intergrupos para cada um dos parâmetros avaliados.

Resultados

Os 19 blocos ósseos enxertados, tanto os dez de origem homogênea quanto os nove de origem autógena, mostraram-se integrados ao leito receptor, com características indicativas de incorporação e aptos a receberem implantes no momento de sua reabertura, isto é, 180 dias após a cirurgia inicial de enxertia óssea (Figura 3).

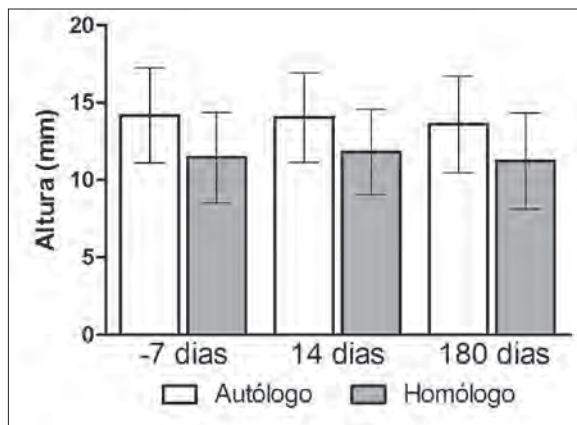
Os dados numéricos obtidos das imagens tomográficas foram avaliados em relação a sua normalidade, como o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA), sendo que os dados referentes à altura e espessura do rebordo alveolar ósseo, dados em milímetros, foram considerados paramétricos e os dados da densidade óssea, dados em unidades Hounsfield, foram considerados não paramétricos, com o uso do teste de D'Agostino & Pearson.

Em relação à altura óssea, apesar da tendência observada de valores menores para o grupo tratado com osso homogêneo (Figura 4), não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em qualquer dos períodos de avaliação ($p > 0.05$, teste *t*) ou entre os períodos, para os dois grupos da pesquisa ($p > 0.05$, teste de Anova).

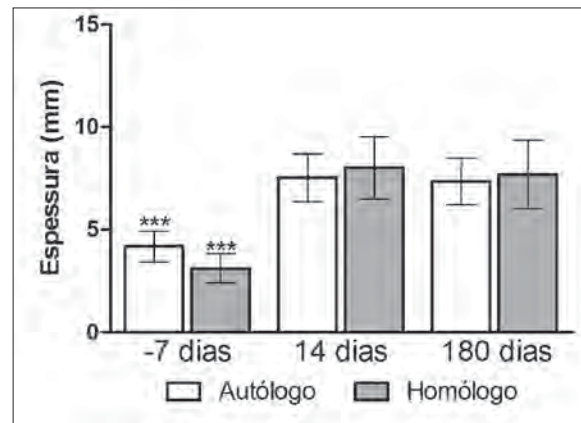


Figura 3

Aspecto clínico dos enxertos homólogos no momento de sua reabertura, 180 dias após a cirurgia inicial. Tanto a vista oclusal (direita) como a vista oclusal (esquerda) evidenciam o avançado estado de remodelação do mesmo.

**Figura 4**

Média e desvio padrão da altura óssea tomográfica, em milímetros. Não foram encontradas diferenças estatísticas semelhantes nas comparações entre os grupos e períodos.

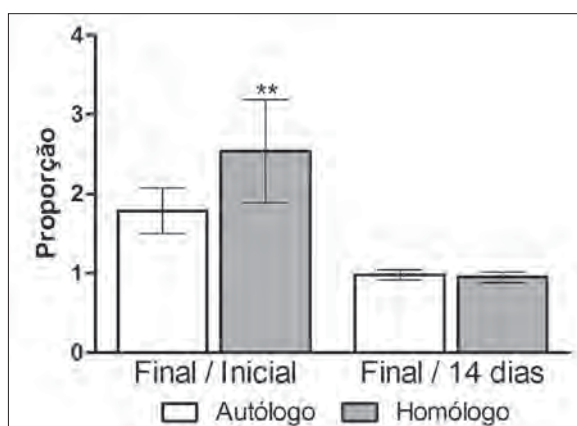
**Figura 5**

Média e desvio padrão da espessura óssea tomográfica, em milímetros. *** Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os valores obtidos no período inicial de observação e os demais ($p < 0,001$, Anova, teste de Tukey).

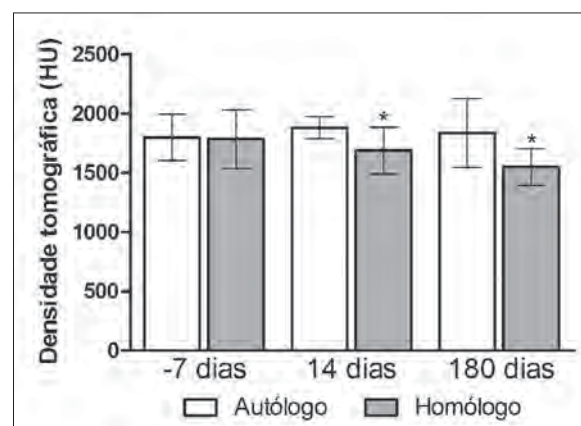
Para a espessura óssea, os grupos homogêneo e autógeno apresentaram resultados estatisticamente semelhantes (Figura 5), com espessura óssea obtida previamente a realização dos enxertos, diferindo significativamente ($p < 0,001$, teste de Anova, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey) da espessura aferida aos 14 dias e aos 180 dias pós-operatórios. Outro resultado relevante diz respeito à proporção direta obtida entre as espessuras obtidas para cada um dos períodos de observação (Figura 6). Levando-se em conta os dados obtidos aos 14 e aos 180 dias pós-operatórios, vemos que a proporção de ganho ou perda na espessura óssea foi estatisticamente semelhante para os dois grupos de estudo, sendo que este valor se manteve muito próximo de 1 ($0,98 \pm 0,06$ para o grupo homogêneo e $0,95 \pm 0,07$ para o grupo autógeno), ou seja, não houve alterações de espessura significativas dentro de cada grupo, entre esses dois períodos de observação. Levando-se em conta os dados obtidos no pré-operatório e aos 180 dias pós-operatórios, veremos que a

proporção de ganho na espessura óssea foi estatisticamente mais significativa ($p < 0,01$, teste de Mann-Whitney) para o grupo tratado com osso homogêneo ($2,54 \pm 0,65$) em relação ao grupo autógeno ($1,79 \pm 0,29$). Este achado se deve ao fato dos enxertos homogêneos apresentarem espessuras iniciais superiores aos enxertos ósseos autógenos, dada a facilidade na sua obtenção.

Finalmente, para a densidade óssea tomográfica, medida em unidades Hounsfield, os resultados demonstraram que, para um mesmo grupo, os valores não diferiram estatisticamente nos três períodos de observação. Já para as comparações entre os grupos, em cada um dos períodos de avaliação, tivemos que tanto aos 14 quanto aos 180 dias pós-operatórios, o grupo tratado com osso homogêneo demonstrou valores inferiores ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) aos obtidos no grupo tratado com osso autógeno; sendo que em todos os casos a média obtida indicava que o osso existente na região seria intermediário entre os Tipos II e III (Figura 7).

**Figura 6**

Proporção direta obtida entre as espessuras ósseas tomográficas inicial e final, para cada um dos períodos de observação. Para a proporção feita entre a espessura final (180 dias) e a inicial (pré-operatória), houve uma diferença significativa entre os dois grupos estudados significativa ($p < 0,01$, teste de Mann-Whitney).

**Figura 7**

Média e desvio padrão da densidade óssea tomográfica, em HU. Dentro de um mesmo grupo, não foram encontradas diferenças entre os períodos. *Diferença, dentro de um mesmo período, entre os valores obtidos em cada um dos grupos de estudo ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

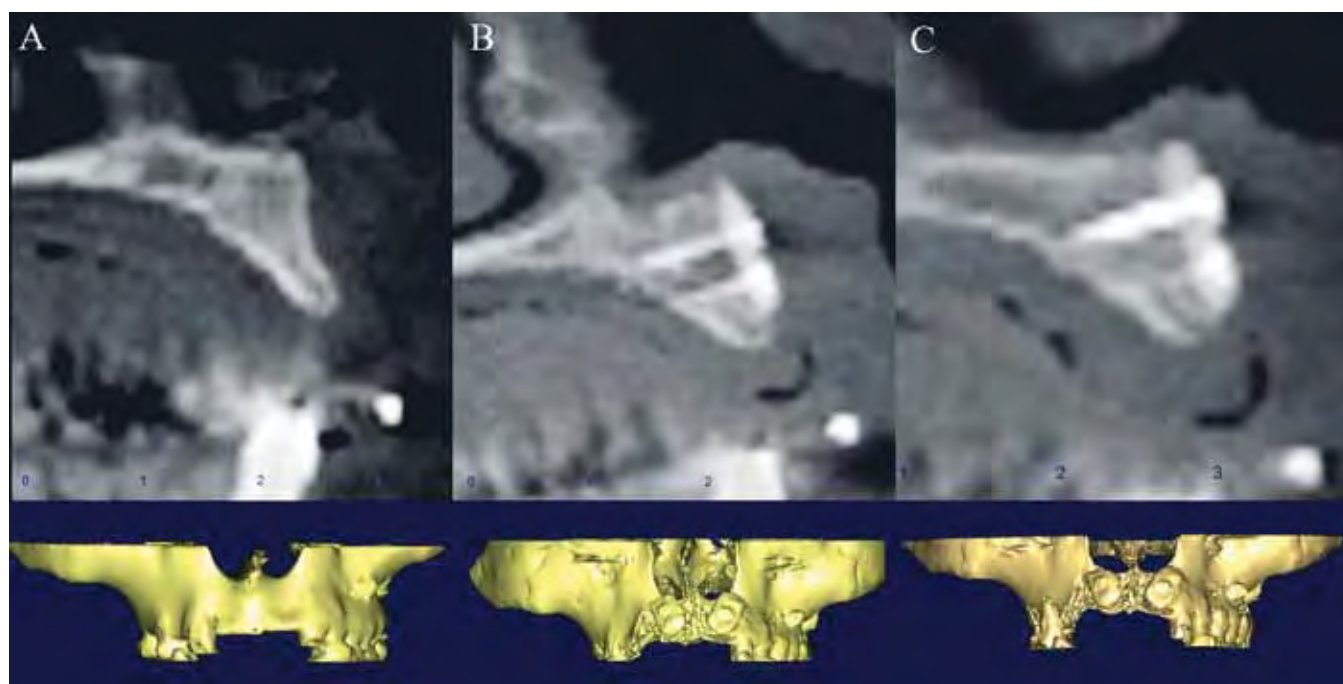


Figura 8

Evolução tomográfica de um caso tratado com osso autógeno. Observar as alterações em espessura e densidade ósseas que ocorrem desde o momento pré-cirúrgico (A), passando pelos 14 dias pós-operatórios (B), até o panorama final, aos 180 dias (C).

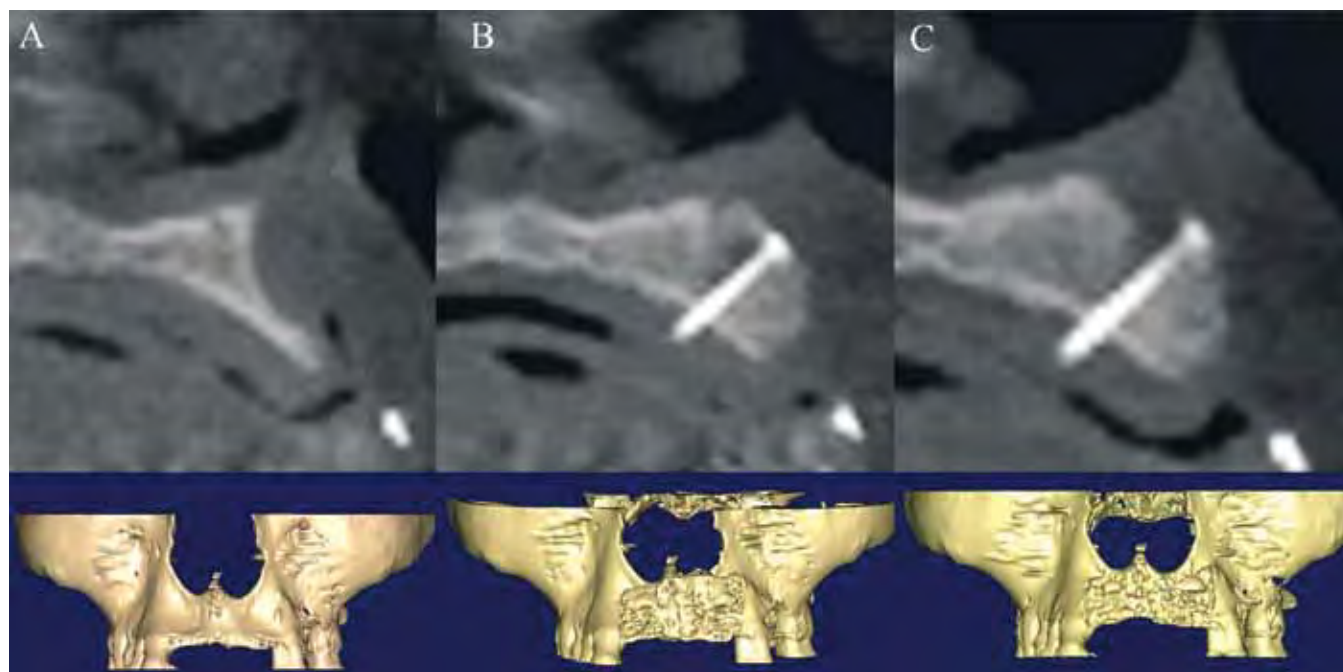


Figura 9

Evolução tomográfica de um caso tratado com osso homólogo. Observar as alterações em espessura e densidade ósseas que ocorrem desde o momento pré-cirúrgico (A), passando pelos 14 dias pós-operatórios (B), até o panorama final, aos 180 dias (C).

Discussão

As propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas dos enxertos autógenos são indiscutíveis e fazem deste enxerto o padrão ouro nos dias atuais¹⁶. Ao mesmo tempo, o uso de enxerto ósseo homogêneo, para correções de deficiências ósseas que impeçam a reabilitação com implantes, tem se mostrado clinicamente viável; sobretudo por evitar o sacrifício de outras estruturas ao manipular áreas doadoras, pela diminuição do tempo cirúrgico e do desconforto pós-operatório, conforme relata a literatura¹⁷⁻¹⁸.

No presente artigo, nossos resultados sugerem que o osso homogêneo foi capaz de promover aumento de espessura considerável quando usado em procedimentos de enxertia e, especialmente, de manter a espessura obtida ao longo de 180 dias, de maneira similar ao osso autógeno (Figuras 8 e 9) sob o ponto de vista tomográfico, apresentando características de densidade óssea compatíveis ao observado no padrão ouro; sendo este um provável indicativo de incorporação do enxerto adequada à finalidade esperada dos mesmos.

A literatura nos mostra que o uso de osso homogêneo como biomaterial é estudado desde o início dos anos 1800, porém, somente nas últimas décadas seu uso foi oficializado e a pesquisa sobre sua aplicação pode atingir os níveis requeridos pela prática odontológica atual¹⁹. Isto porque, anteriormente ao desenvolvimento das tecnologias de processamento de tecidos, o osso homogêneo era utilizado fresco, obtido do cadáver ou de um doador vivo, com riscos de contaminação ou rejeição iminentes, prejudicando assim, os resultados obtidos²⁰. Seguindo os protocolos atuais de captação e processamento deste tipo de tecido, tanto a Ortopedia quanto a Odontologia têm se beneficiado das aplicações clínicas deste biomaterial, com poucos, porém interessantes, resultados relatados na literatura²¹⁻²².

Taxas de sucesso, entendido pela correta incorporação dos enxertos homogêneos, variando entre 60 e 90% são evidenciadas pela literatura da área de Ortopedia Médica, dados estes avaliados de maneira clínica e radiográfica²³⁻²⁵. Na área Odontológica, estudos citando taxas de sucesso, especialmente a longo prazo, são ainda escassos e pouco padronizados.

Seguindo a metodologia utilizada em nossa pesquisa, podemos dizer que o uso de tomografias computadorizadas no complexo maxilofacial têm se mostrado como ferramenta de excelência para a avaliação de procedimentos cirúrgicos, como os de enxertia óssea. Os programas de reformatação destas imagens, como o que foi utilizado na pesquisa, conseguem demonstrar com precisão os limites e contornos do tecido ósseo nativo e até mesmo dos blocos ósseos enxertados em um primeiro momento; divisão esta que se perde com o passar do tempo com a incorporação destes blocos. Além disto, a correlação das medidas obtidas nestas imagens com o que é observado clinicamente é muita alta, tornando a to-

Taxas de sucesso, entendido pela correta incorporação dos enxertos homogêneos, variando entre 60 e 90% são evidenciadas pela literatura da área de Ortopedia Médica, dados estes avaliados de maneira clínica e radiográfica²³⁻²⁵. Na área Odontológica, estudos citando taxas de sucesso, especialmente a longo prazo, são ainda escassos e pouco padronizados.

mografia uma ferramenta diagnóstica realmente confiável²⁶.

A literatura ainda é pobre ao abordar sobre enxertos ósseos homólogos da maneira como foi mostrado neste trabalho. Apesar disto, existem poucos estudos sobre enxertos autólogos, em humanos, que utilizaram o método tomográfico para obter resultados referentes a manutenção óssea volumétrica dos enxertos^{12,27-28}. Ponto pacífico nestes estudos seria a pequena perda de volume ósseo que ocorre de maneira concomitante a sua remodelação, sendo que a maioria dos resultados relatados afirma que esta perda seria de cerca de 0,5 a 1 mm em espessura no primeiro ano; ou seja, mantendo uma proporção muito próxima de 1 quando comparadas a espessura óssea obtida imediatamente após a enxertia e nos momentos subsequentes, quando da instalação de implantes de titânio, tal qual mostrado em nosso estudo^{12,27-28}.

Estas pequenas alterações na espessura poderiam também estar relacionadas a descalcificação e alteração no volume do trabeculado ósseo durante a remodelação dos enxertos²⁹. Em nosso trabalho, o grupo tratado com osso homogêneo demonstrou menores valores de densidade óssea tomográfica do que o grupo tratado com osso autólogo; embora, esta diminuição não tenha se mostrado estatisticamente significativa quando avaliamos os diferentes períodos dentro do mesmo grupo de estudo. A literatura relata a possibilidade de que quando estas alterações de densidade mostram-se pequenas, como as aqui relatadas, este fato poderia ser produto exclusivo dos processos de remodelação, sem que houvesse perda relevante de altura e espessura ósseas, como também foi demonstrado por nossos resultados; porém, sem fornecer resultados histológicos ou histométricos que ratifiquem esta informação²⁹⁻³⁰. Outra hipótese que também poderia justificar este dado seria a diferente proporção de osso cortical/medular presente nos dois tipos de enxertos ósseos utilizados. Para conclusões mais definitivas ainda são necessários estudos histológicos

a médio e longo prazo, avaliando a incorporação e índice de remodelação dos enxertos ósseos homólogos em comparação aos enxertos ósseos autógenos.

Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos nesta pesquisa, e dentro de suas limitações, pode-se concluir que o enxerto de osso autólogo e homogêneo em bloco, apresentaram, sob o ponto de vista tomográfico, manutenção de espessura e densidade em um período de 180 dias pós-operatórios, permitindo a instalação e reabilitação com implantes osseointegráveis.

Endereço para correspondência:

Rubens Spin-Neto
Dep. de Diagnóstico e Cirurgia – Unesp
 Rua Humaitá, 1.680
 14801-903 - Araraquara - SP
 Tel.: (16) 3301-6378 / Fax: (16) 3301-6369
 netorubens@yahoo.com.br

Referências bibliográficas

- Albert A, Leemrijse T, Druetz V, Delloe C, Cornu O. Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study of bone grafting. *Acta Orthop Belg* 2006;72(6):734-40.
- Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993;13(1):29-45.
- Contar CM, Sarot JR, Bordini Jr J, Galvao GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(6):1280-5.
- Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000;1999 Feb;19:151-63.
- Misch CE. Implant dentistry. *Dent Today* 2002;21(11):62.
- Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983;174:69-86.
- Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990;14(3):243-8.
- Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64(2):270-9.
- Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999;30(4):571-81.
- Friedlaender GE. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 1987;(225):17-21.
- Donovan MG, Dickerson NC, Hellstein JW, Hanson LJ. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51(8):898-903.
- Iturriaga MT, Ruiz CC. Maxillary sinus reconstruction with calvarium bone grafts and endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(3):344-7.
- Holmquist P, Dasmah A, Sennerby L, Hallman M. A new technique for reconstruction of the atrophied narrow alveolar crest in the maxilla using morselized impacted bone allograft and later placement of dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10(2):86-92.
- Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(4):393-401.
- Schultze-Mosgau S, Keweloh M, Wiltfang J, Kessler P, Neukam FW. Histomorphometric and densitometric changes in bone volume and structure after avascular bone grafting in the extremely atrophic maxilla. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2001;39(6):439-47.
- Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent* 1995;4(4):261-7.
- Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am* 1987;18(2):235-9.
- Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank* 2000;1(2):105-9.
- Carr CR, Hyatt GW. Clinical evaluation of freeze-dried bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1955;37-A(3):549-66.
- Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997;40(3):588-603.
- Schreurs BW, Arts JJ, Verdonchot N, Buma P, Slooff TJ, Gardeniers JW. Femoral component revision with use of impaction bone-grafting and a cemented polished stem. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88 Suppl 1 Pt 2:259-74.
- van der Donk S, Weernink T, Buma P, Aspenberg P, Slooff TJ, Schreurs BW. Rinsing morselized allografts improves bone and tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res* 2003;(408):302-10.
- Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(432):210-6.
- Mankin HJ, Hornicek FJ. Treatment of giant cell tumors with allograft transplants: a 30-year study. *Clin Orthop Relat Res* 2005;439:144-50.
- Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;(324):86-97.
- Abrahams JJ. Dental CT imaging: a look at the jaw. *Radiology* 2001;219(2):334-45.
- Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(5):607-15.
- Smolka W, Eggensperger N, Carollo V, Ozdoba C, Iizuka T. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(2):149-55.
- Norton MR, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(1):79-84.
- Sivarajasingam V, Pell G, Morse M, Shepherd JP. Secondary bone grafting of alveolar clefts: a densitometric comparison of iliac crest and tibial bone grafts. *Cleft Palate Craniofac J* 2001;38(1):11-4.

Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis.

Rubens Spin-Neto, MSc^a; Andreas Stavropoulos, PhD, dr.odont.^{b,c}; Luís Antônio Violin Dias Pereira, PhD^d; Elcio Marcantonio Jr, PhD^a; Ann Wenzel, PhD, dr.odont.^e.

^aDepartment of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Periodontology, School of Dentistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

^cCenter for Experimental and Preclinical Biomedical Research, (CEPBR), Athens, Greece.

^dDepartment of Histology and Embryology, UNICAMP – State University of Campinas, Institute of Biology, Campinas, São Paulo, Brazil.

^eDepartment of Oral Radiology, School of Dentistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

Running title: Ridge augmentation with autografts vs. fresh-frozen allografts

Key-words: *Bone allograft; autograft; bone resorption; ridge augmentation; CBCT; tomographic evaluation.*

Corresponding author:

Rubens Spin Neto

Department of Periodontology - UNESP, São Paulo State University

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14801-903 - Araraquara-SP, BRAZIL

Fax: 55-16-3301-6369/3301-6378

E-mail: netorubens@yahoo.com.br

Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis.

Abstract

Objectives: To evaluate dimensional changes in autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts 6 months after alveolar ridge augmentation. **Material and methods:** Twenty-six partially or totally edentulous patients treated either with fresh-frozen allogeneic bone (AL) or autologous bone onlay block grafts (AT) prior to implant placement (13 patients in each group), were included in this analysis. Patients received CBCT (i-CAT Classic) examinations prior to surgery and 14 days (14d) and 6 months (6m) after grafting. Differences in alveolar ridge area among the various observation times were evaluated by planimetric measurements on 2-D CBCT images of the grafted regions. Nineteen grafted blocks from each group were evaluated. **Results:** Significant increase in alveolar ridge dimensions, allowing implant placement, was obtained with both types of grafts 6m after grafting; no significant differences in alveolar ridge area were observed between the groups at the various observation times. However, graft resorption in the AL group was significantly larger compared to that in the AT group at 6m. **Conclusions:** Larger bone graft resorption was seen in patients treated with fresh-frozen allogeneic bone than in those treated with autologous bone 6 months following alveolar ridge augmentation.

Introduction

High success rates in implant treatment are strongly connected to an adequate bone volume, which enables the installation of dental implants at the right position and maintains osseointegration over time (Akagawa et al. 1992, Sahin et al. 1996, Wadamoto et al. 1996). In cases where an adequate bone volume is not available, various reconstructive techniques including bone grafting, can be employed to re-establish the maxillo-facial bone anatomy before or at the time of implant placement (Chiapasco et al. 2006, Goldberg & Stevenson 1987, Goldberg & Stevenson 1993, Goldberg & Stevenson 1994).

Autologous bone grafting remains the most predictable and best documented method – considered the gold standard – for bone augmentation (Capelli 2003, Donovan et al. 1994, Keller & Triplett 1987, Misch & Misch 1995, Nowzari & Aalam 2007). The technique, however, has disadvantages such as donor site morbidity, post surgical pain, nerve and soft tissue injuries, increased operative time and deficiencies in the quality and quantity of available bone (Leonetti & Koup 2003, Waasdorp & Reynolds 2010). Besides that, the vitality of autografts is not always completely evident since the majority of the osteocytes of monocortical bone grafts do not survive the grafting procedure, and thus portions of non-vital bone remain for extended periods of time, until they progressively remodel into new vital bone several months after grafting (Zerbo et al. 2003).

Among the possible alternatives to autologous bone grafting is the use of fresh-frozen allogeneic bone grafts (Collins et al. 1998, de Boer 1988, Goldberg & Stevenson 1987, Goldberg & Stevenson 1993, Zerbo et al. 2003). Allogeneic bone grafts possess advantages such as availability, the absence of a second surgical area and reduced surgical time (Mankin et al. 1983).

In the last decades, the use of fresh-frozen bone allografts has increased exponentially (de Boer 1988, Dodd et al. 1988, Tomford 2000). In comparison with autologous bone, fresh-frozen allogeneic bone grafts have resulted in significantly poorer outcomes with slower remodeling and a solely osteoconductive action, but standardized human studies are lacking (Bach et al. 1991, Brown & Cruess 1982, Mizutani et al. 1990). Concerns regarding the antigenicity and the risk of disease transmission (such as hepatitis or HIV) with the use of bone allografts have been raised previously (Leslie & Bottenfield 1989), however it is advocated that if strict guidelines for donor bone tissue processing are followed (Palmer et al. 1999, Tomford et al. 1983), fresh-frozen allografts should be considered safe to use, and the risk of disease transmission should be low (Waasdorp & Reynolds 2010).

The gold standard evaluation method to characterize the fate of grafted bone over time is histology; however, histological evaluation is most of the time not possible in clinical settings, and non-invasive imaging methods have been suggested for this purpose (Bauer & Muschler 2000, Eppley et al. 2005, Giannoudis et al. 2005). Cone Beam Computerized Tomography (CBCT) may be a potentially efficient tool to evaluate the treatment outcome after grafting procedures or for long-term monitoring (Ehrhart et al. 2008, Grauer et al. 2009) since the technique has the advantage of a relatively low image acquisition time and patient radiation dose (De Vos et al. 2009). CBCT images have been used previously to evaluate the fate of bone grafts (Acocella et al. 2009, Oberoi et al. 2009, Verdugo et al. 2010, Verdugo et al. 2009a, Verdugo et al. 2009b).

The aim of the present study was to evaluate the dimensional changes in autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts 6 months after alveolar ridge augmentation, based on the analysis of CBCT 2-D image sections.

Materials and Methods

The research protocol of this controlled case series study was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee (CEP-FO/Car) and by the National Research Ethics Committee (CONEP-MS) under the protocol number 36/08, and it is in accordance to the World Medical Association Declaration of Helsinki (2002). All treatments were performed in the Department of Periodontology, Araraquara Dental School (UNESP – Univ. Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil.

Patient selection

A total of 32 partially or totally edentulous patients, who desired oral rehabilitation with titanium implants and had at least one site with severe bone deficiency (i.e., <4 mm alveolar ridge width) not allowing the placement of a regular size implant, were treated from May to December 2009. Alveolar ridge width was determined on the cross-sectional image section view of CBCT (i-CAT Classic, Imaging Sciences International, USA) generated images (DICOM-based data sets) with a resolution of 96 dpi, 14-bits gray scale and 0.25 mm voxel size. The CBCT unit was set at 120 kVp, 5 mA, with a 20 sec. exposure time. None of the patients presented with systemic diseases affecting bone turnover, or were pregnant or lactating, or had habits that could interfere with treatment (for example: smoking, alcoholism and drug use).

Treatment allocation was not randomly assigned. Patients judged not to possess adequate amounts of donor (autologous) bone were treated with fresh-frozen bone allografts. This decision was taken based on the clinical screening examination and the CBCT examination and depended on the amount of bone resorption and/or number of sites requiring reconstruction in each patient. Thus, thirteen patients were treated with autologous bone grafts (20 bone blocks; AT group) and nineteen patients were treated with fresh-frozen allogeneic bone grafts (52 bone blocks; AL group). In order to have an equal number of patients per group for evaluation, the 13 patients from the AT group were randomly selected (by a drawing a lot). Matching was performed at the block/region level as follows: the blocks in one randomly chosen patient from the AT were matched with blocks placed in the same region (anterior maxilla, posterior maxilla, or posterior mandible) in a randomly chosen patient (with the same or a larger number of blocks) from the AL group. Finally, 14 bone grafts in the anterior maxilla, 3 in the posterior maxilla and 2 in the posterior mandible were evaluated in each group. Population and block sample characteristics are presented in Tables 1 & 2, respectively.

Evaluation of pre-existing CBCT images from patients not included in the study but treated similarly to herein has shown that a bone graft area resorption of 5% and 10% could be expected in the AT and AL group, respectively. Thus, 18 pairs of bone blocks were needed to achieve a statistical power of 80%.

According to Brazilian regulations, documents regarding the allogeneic biomaterial request were filled-out and sent to the registered bone bank that supplied the allografts (UniOss, Marília, Brazil). The fresh-frozen allogeneic bone was collected and processed according to the American Association of Tissue

Banking guidelines (Tomford & Mankin, 1999) and delivered at the University Clinic on the day before surgery. Briefly, the bone is collected from strongly screened deceased tissue-donors, and processed, freezed, cleaned, trimmed, and packaged under sterile conditions. In Brazil, this material is available only for specialists in Maxillofacial Surgery, Periodontology or Implantology.

Surgical procedures

Immediately prior to the augmentation surgery, a mouth rinse was performed with 10-15 ml 0.12% Chlorhexidine digluconate for one minute and Povidine-iodine 10% solution was applied to the peri-oral skin. Then, under local anesthesia a full thickness flap was raised to provide a full visualization of the resorbed alveolar ridge. Any reminiscent soft tissues were removed from the bone surface, and delicate burs were used under intense saline solution irrigation to penetrate the host cortical bone for enhancing vascularization towards the base of the grafts. In the AT group, grafts of adequate size according to defect dimensions were retrieved from the mandibular ramus. In the AL group, standard size cortico-cancellous bone blocks (15 x 10 x 6 mm) were removed from the freezer and put into sterile saline solution for 10 minutes, allowing them to hydrate and obtain room temperature gradually. Both types of blocks were trimmed to fit the defects using #700 cylindrical and maxi-cut burs under abundant sterile saline solution irrigation. The trimming procedure deliberately reduced also the excessive amount of cancellous bone in the AL blocks. The blocks were fixed with the cancellous bone side facing the host bone using 1.5 mm in Ø x 10 or 12 mm long titanium screws (Neodent, Curitiba, Brazil) (**Figure 1**) and covered by a collagen membrane (Genius Baumer, São Paulo, Brazil). Then, the flaps were

repositioned to cover the grafts completely and were sutured with interrupted nylon 4-0 single sutures.

All patients received antibiotics (Amoxicillin 500 mg) three times daily for seven days, non-steroidal anti-inflammatory treatment (Nimesulide 100 mg) two times daily for five days, and analgesics (Acetaminophen 750 mg) according to individual needs. Patients continued to rinse with Chlorhexidine digluconate for the following 7 days. Sutures were removed 14 days after surgery.

CBCT image section assessment

All patients were scanned again 14 days (14d) and 6 months (6m) after grafting. The CBCT images were acquired using the same exposure parameters as previously described. The DICOM data sets were saved on a hard disk and reconstructed using specific software (OnDemand 3D 1.0.7.0295, Cybermed, Seoul, South Korea) to reconstruct the image sections and export the 2-dimensional image sets for the quantitative evaluation of bone size.

Since image section generation from the presurgical CBCT scans could not be performed in a standardized manner and with the same spatial orientation due to absence of a fixed reference feature (i.e. the fixation screw), only the data sets obtained at 14d and 6m were used for the present analysis. The graft fixation screw was used as a guide to re-orientate the data sets from the two time-points, so that sections with the same spatial orientation could be generated for both time-points. Based on the screw position, 0.25 mm thick cross-sections (distance between sections = 1 mm) through the bone block and the residual ridge and jaw bone were generated parallel to the long axis of the screw and perpendicular to the occlusal plane. The same number of sections was generated for each

individual block for both observation periods. In total, 352 sections were generated at each period. The exhibition contrast of the images was adjusted, and the center level (L) and band-width (W) were set according the suggestions in the software (W=3086 and L=667).

For every CBCT section, one TIF (tagged image file) image was generated. The images had a resolution of 96 dpi matching the scanner resolution and therefore avoiding any distortion. They contained a ruler, which allowed the setting of the linear scale of each image. All generated images were anonymized and randomized at the patient level, in order to blind the evaluator with respect to treatment group.

The assessment of the TIF images was performed using specific image processing software (ImageJ, NIH, USA) by manually tracing the structures under study with the computer mouse. Pilot evaluation of 5 patients revealed that, in many instances, it was difficult to differentiate between block graft and the pristine residual ridge at the 6m images. Thus, in order to attain a measuring standard in the 6m images, the total maxillary or mandibular bone area (TBA_{6m} , in mm^2) visible in each image section was included (i.e. traced). In the 14d images, TBA (TBA_{14d}) was estimated by adding the traced areas of the grafted bone block and the host bone (**Figures 2 and 3**). The changes in bone area (CBA) over time (from 14d to 6m) were also calculated and expressed as a percentage of bone area at 14d. Finally, to evaluate the reproducibility of the measurements, 30% of the sample was measured in duplicate with at least two weeks between measurements, and the differences were tested using Pearson's correlation analysis.

Data Analysis

Commercially available software (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) was utilized to compare mean bone area over time and draw graphics. For the grafted bone block, host bone and TBA, comparison between groups was based on the average bone area calculated from measurements of all sections of each block ("Average"). For CBA, comparisons between groups was done on three levels: 1) "Average"; 2) the bone area from the middle section of each block ("Middle"); and 3) the average bone areas calculated from the first and last section ("Boundary") of each block. Data was subjected to normality test analysis (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). Normally distributed data (host bone area, TBA and CBA) was evaluated using repeated measures ANOVA followed by Tukey post-test for multiple comparisons and paired t-tests, and the repeating variable considered was the block graft. Data that were not normally distributed (grafted bone block area) was evaluated using Wilcoxon's test. The reproducibility of the measurements was calculated using Pearson's correlation analysis. Statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

The statistical power of the study, calculated based on the CBA, was 90.7%. Evaluation of reproducibility of the measurements showed no statistically significant differences between the two sets of measurements, with an r^2 of 0.84, 0.86 and 0.88, considering the three different measured areas - host bone, grafted bone block, and total bone area - respectively.

During the post-operative period, one block graft became exposed (30 days after surgery) and two grafts were lost in the AL group (the grafted region still

presented inflammation signs 60 days after surgery, and using a surgical approach it was seen that the fixation screw of the grafts was loosened).

Host bone was statistically similar for the AT and the AL group. The global ANOVA analysis detected a highly significant difference ($p \leq 0.001$) between the periods of evaluation, inside each group. Software package which was used for the statistical evaluation of data (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) does not return the exact p values for multiple comparison tests. For both groups, a significant increase in TBA was observed from baseline to 14d and 6m ($p \leq 0.001$ and $p \leq 0.01$, respectively). No statistically significant differences were observed between the AT and AL groups regarding TBA at both observation times. Nevertheless, the grafted bone block area, as observed in the 14 days images, was larger in the AL group ($p \leq 0.001$). Additionally, TBA_{6m} in the AL group was significantly smaller compared to TBA_{14d} ($p \leq 0.01$) (**Table 3 and Figure 4**).

Regarding CBA (%), statistically significant differences were found between the groups only for “Average” with the AL showing larger bone loss ($p = 0.0038$). Regarding the different grafted regions, AL showed more ($p = 0.0155$) bone loss in the anterior maxillary region compared to AT, based on “Average” image data. For the posterior mandibular and maxillary regions, CBA was statistically similar for both groups, although a tendency ($p = 0.0801$) towards a greater bone loss could be seen for AL in the posterior maxillary region. These results are shown in **Table 3 and Figures 5-6**.

Discussion

Constraints in autologous bone (AT) block graft availability from intraoral sites often limit treatment possibilities (Waasdorp & Reynolds 2010). Therefore, the use of fresh-frozen allogeneic bone (AL) grafts as an alternative to AT has increased exponentially in the last decades and accounts for about one third of bone grafts used in dentistry and orthopedics in the United States (Giannoudis et al. 2005). Recent studies have reported that allogeneic fresh-frozen bone may provide results equivalent to those achieved with autologous bone grafts (Carinci et al. 2010, Carinci et al. 2009a, Carinci et al. 2009b, Waasdorp & Reynolds 2010). However insufficient evidence is currently available regarding treatment efficacy of allogeneic block grafts, e.g. volumetric changes and remodeling/incorporation within the host bone, and the long-term survival rates of subsequently inserted implants (Waasdorp & Reynolds 2010).

The results of the present study showed that both types of grafts provided a statistically significant increase in TBA after the grafting procedure. TBA after 6 months was equal in the two groups, i.e. both treatments restored the alveolar bone to a degree that allowed implant installation. Evaluation of the final treatment was not part of the present study, but implants could be placed in the planned positions and were successfully osseointegrated in all cases. Obviously, no assumptions can be made regarding the qualitative characteristics of bone in the grafted region based on the radiographic data.

The alveolar ridges of patients in the AL group were narrower compared to those in the AT group; the lack of statistical difference in host bone area between the two groups observed at 14d was due to the fact that during host bone estimation, the entire maxillary or mandibular bone area visible in each image section was included (i.e. traced), and obviously the 1-2 mm difference in width of the alveolar

ridges in the two groups prior to surgery only amounted to a small fraction of the entire area. In this context, the AL bone blocks in the present study were initially significantly larger than the AT blocks, but since the alveolar ridges receiving these grafts were also narrower, this fact did not result in wider alveolar ridges at 14d. On the other hand, CBA in the AL group was larger than that in the AT group, independent of the grafted region or level of evaluation (reg. AVG: -9.33% vs. 2.57% in the AL and AT groups, respectively). Taking into account the fact that CBA must reflect bone resorption most likely involving primarily the grafted block itself, a loss of about one third of the grafted block volume in the AL group should be considered. This finding has to be kept in mind during treatment planning involving alveolar ridge augmentation procedures with AL grafts and indicates the need for AL bone blocks of larger dimensions to compensate for their expected considerable resorption. The observed difference in resorption between the two groups may be due to the different architecture of the AL and AT grafts. It has previously been demonstrated that different graft architecture in terms of cortical/cancellous bone rate (Bohner et al. 2011) has a direct influence on the dynamics of bone remodeling, i.e., the larger the cancellous bone proportion, the larger the resorption. Although during trimming, prior to application of the blocks, the excessive amount of cancellous bone in the AL grafts was deliberately reduced, still AL grafts contained a larger cancellous portion compared to AT blocks. The larger resorption of the AL grafts can also be explained by inadequate revascularization, less bone ingrowth inside the grafted block, and/or a smaller number of cells involved in the remodeling process of this type of bone grafts (Goldberg & Stevenson 1987, Goldberg & Stevenson 1993, Goldberg & Stevenson 1994). In the present study, the block grafts in both

groups were covered with a collagen membrane after fixation. Similarly to previous reports, application of a membrane according to the guided bone regeneration (GBR) principle failed herein to completely prevent resorption of the grafted bone (Gielkens et al. 2007); nevertheless, whether application of a membrane has any influence on AL bone block resorption remains unknown.

Previous studies have assessed the fate of bone grafts used in association with GBR procedures also using CBCT (Santoro et al. 1999, Sbordone et al. 2009, Smolka et al. 2006) but there are no relevant studies in the literature evaluating fresh-frozen allogeneic bone grafts in humans. CBCT is an imaging technology with the possibility of 3-D manipulation and segmentation of the generated images. Using CBCT, the settings for image sectioning and display, such as section thickness and mapping of scalar values stored within the image shown to the user (e.g. contrast control), can vary (Chadwick & Lam 2010, Gibaud 2010). In previous studies evaluating bone grafts using CBCT, the selection of the settings related to image generation and manipulation, such as cross-sectional section thickness, inter-section interval, windowing (contrast control) and resolution, was not described and seemingly not standardized (Acocella et al. 2009, Oberoi et al. 2009, Verdugo et al. 2010, Verdugo et al. 2009a, Verdugo et al. 2009b). However, these settings may have a large impact on the characteristics of the final images as shown in a recent review (Spin-Neto et al. 2011). The present study describes in detail all settings used for image generation in order to enhance the reproducibility of our methodology and to permit our results to be compared to other standardized studies. Hounsfield unit derived values were not calculated since the voxels in CBCT imaging are not always isotropic as for traditional medical CT.

In conclusion, similar amounts of bone, allowing implant installation, were observed 6 months following alveolar ridge augmentation with autogenous and fresh-frozen allogeneic bone grafts. However, significantly larger bone graft resorption was seen in patients treated with allogeneic bone than in those treated with autogenous bone.

Acknowledgements

This study was financed by the Brazilian agencies Fapesp (2008/09207-9), CAPES (0050/10-5) and CNPq.

References

- Acocella, A., Sacco, R., Niardi, P. & Agostini, T. (2009) Early implant placement in bilateral sinus floor augmentation using iliac bone block grafts in severe maxillary atrophy: A clinical, histological, and radiographic case report. *Journal of Oral Implantology* **35**: 37-44.
- Akagawa, Y., Wadamoto, M., Sato, Y. & Tsuru, H. (1992) The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: A method for study. *Journal of Prosthetic Dentistry* **68**: 813-816.
- Bach, D. E., Burgess, L. P., Zislis, T., Quigley, N. & Hollinger, J. O. (1991) Cranial, iliac, and demineralized freeze-dried bone grafts of the mandible in dogs. *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* **117**: 390-395.
- Bauer, T. W. & Muschler, G. F. (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **458**: 10-27.
- Bohner, M., Loosli, Y., Baroud, G. & Lacroix, D. (2011) Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomaterialia* **7**: 478-484.
- Brown, K. L. & Cruess, R. L. (1982) Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *Journal of Bone and Joint Surgery* **64**: 270-279.

- Capelli, M. (2003) Autogenous bone graft from the mandibular ramus: A technique for bone augmentation. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **23**: 277-285.
- Carinci, F., Brunelli, G., Franco, M., Viscioni, A., Rigo, L., Guidi, R. & Strohmer, L. (2010) A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **12**: 91-98.
- Carinci, F., Brunelli, G., Zollino, I., Franco, M., Viscioni, A., Rigo, L., Guidi, R. & Strohmer, L. (2009a) Mandibles grafted with fresh-frozen bone: An evaluation of implant outcome. *Implant Dentistry* **18**: 86-95.
- Carinci, F., Guidi, R., Franco, M., Viscioni, A., Rigo, L., De Santis, B. & Tropina, E. (2009b) Implants inserted in fresh-frozen bone: A retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence International* **40**: 413-419.
- Chadwick, J. W. & Lam, E. W. (2010) The effects of slice thickness and interslice interval on reconstructed cone beam computed tomographic images. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **110**: e37-42.
- Chiapasco, M., Zaniboni, M. & Boisco, M. (2006) Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clinical Oral Implants Research* **17 Suppl 2**: 136-159.
- Collins, M., James, D. R. & Mars, M. (1998) Alveolar bone grafting: A review of 115 patients. *European Journal of Orthodontics* **20**: 115-120.
- de Boer, H. H. (1988) The history of bone grafts. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **446**: 292-298.
- De Vos, W., Casselman, J. & Swennen, G. R. (2009) Cone-beam computerized tomography (cbct) imaging of the oral and maxillofacial region: A systematic review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **38**: 609-625.
- Dodd, C. A., Fergusson, C. M., Freedman, L., Houghton, G. R. & Thomas, D. (1988) Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery (British Volume)* **70**: 431-434.
- Donos, N., Kostopoulos, L., Tonetti, M., Karring, T. (2005) Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research* **16**:133-9.

- Donovan, M. G., Dickerson, N. C. & Mitchell, J. C. (1994) Calvarial bone harvest and grafting techniques for maxillary and mandibular implant surgery. *Atlas of Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* **2**: 109-122.
- Ehrhart, N., Kraft, S., Conover, D., Rosier, R. N. & Schwarz, E. M. (2008) Quantification of massive allograft healing with dynamic contrast enhanced-mri and cone beam-ct: A pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **466**: 1897-1904.
- Eppley, B. L., Pietrzak, W. S. & Blanton, M. W. (2005) Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of Craniofacial Surgery* **16**: 981-989.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. (2005) Bone substitutes: An update. *Injury* **36 Suppl 3**: S20-27.
- Gibaud, B. (2010) The quest for standards in medical imaging. *European Journal of Radiology*. EPub.
- Gielkens, P.F., Bos, R.R., Raghoobar, G.M., Stegenga, B. (2007) Is there evidence that barrier membranes prevent bone resorption in autologous bone grafts during the healing period? A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **22**:390-8.
- Goldberg, V. M. & Stevenson, S. (1987) Natural history of autografts and allografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **445**: 7-16.
- Goldberg, V. M. & Stevenson, S. (1993) The biology of bone grafts. *Seminars in Arthroplasty* **4**: 58-63.
- Goldberg, V. M. & Stevenson, S. (1994) Bone graft options: Fact and fancy. *Orthopaedics* **17**: 809-810, 821.
- Grauer, D., Cevdanes, L. S. & Proffit, W. R. (2009) Working with dicom craniofacial images. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics* **136**: 460-470.
- Keller, E. E. & Triplett, W. W. (1987) Iliac bone grafting: Review of 160 consecutive cases. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **45**: 11-14.
- Leonetti, J. A. & Koup, R. (2003) Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: Case reports. *Implant Dentistry* **12**: 217-226.
- Leslie, H. W. & Bottenfield, S. (1989) Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nursing Clinics of North America* **24**: 891-905.

- Mankin, H. J., Doppelt, S. & Tomford, W. (1983) Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **441**: 69-86.
- Misch, C. M. & Misch, C. E. (1995) The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dentistry* **4**: 261-267.
- Mizutani, A., Fujita, T., Watanabe, S., Sakakida, K. & Okada, Y. (1990) Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *International Orthopaedics* **14**: 243-248.
- Nowzari, H. & Aalam, A. A. (2007) Mandibular cortical bone graft part 2: Surgical technique, applications, and morbidity. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* **28**: 274-280.
- Oberoi, S., Chigurupati, R., Gill, P., Hoffman, W. Y. & Vargervik, K. (2009) Volumetric assessment of secondary alveolar bone grafting using cone beam computed tomography. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* **46**: 503-511.
- Palmer, S. H., Gibbons, C. L. & Athanasou, N. A. (1999) The pathology of bone allograft. *Journal of Bone and Joint Surgery (British Volume)* **81**: 333-335.
- Sahin, S., Akagawa, Y., Wadamoto, M. & Sato, Y. (1996) The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. II: A morphometric evaluation after three months of loading. *Journal of Prosthetic Dentistry* **76**: 176-180.
- Santoro, F., Maiorana, C. & Rabagliati, M. (1999) Long-term results with autogenous onlay grafts in maxillary and mandibular atrophy. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* **9**: 215-222.
- Sbordone, L., Toti, P., Menchini-Fabris, G. B., Sbordone, C., Piombino, P. & Guidetti, F. (2009) Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **38**: 1059-1065.
- Smolka, W., Eggensperger, N., Carollo, V., Ozdoba, C. & Iizuka, T. (2006) Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 149-155.
- Spin-Neto, R., Gottfredsen, E., Marcantonio Jr., E. & Wenzel, A. (2011) Exploring cbct-based dicom files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. *Journal of Digital Imaging*. Epub.

- Tomford, W. W. (2000) Bone allografts: Past, present and future. *Cell and Tissue Banking* **1**: 105-109.
- Tomford, W. W., Doppelt, S. H., Mankin, H. J. & Friedlaender, G. E. (1983) 1983 bone bank procedures. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **441**: 15-21.
- Tomford, W. W., Mankin, H. J. (1999) Bone banking. Update on methods and materials. *Orthopedic Clinics of North America*. **30**:565-70.
- Verdugo, F., D'Addona, A. & Ponton, J. (2010) Clinical, tomographic, and histological assessment of periosteal guided bone regeneration with cortical perforations in advanced human critical size defects. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. EPub.
- Verdugo, F., Simonian, K. & Nowzari, H. (2009a) Periodontal biotype influence on the volume maintenance of onlay grafts. *Journal Periodontology* **80**: 816-823.
- Verdugo, F., Simonian, K., Smith McDonald, R. & Nowzari, H. (2009b) Quantitation of mandibular ramus volume as a source of bone grafting. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **11 Suppl 1**: e32-37.
- Waasdorp, J. & Reynolds, M. A. (2010) Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **25**: 525-531.
- Wadamoto, M., Akagawa, Y., Sato, Y. & Kubo, T. (1996) The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. I: A morphometric evaluation in initial healing. *Journal of Prosthetic Dentistry* **76**: 170-175.
- Zerbo, I. R., de Lange, G. L., Joldersma, M., Bronckers, A. L. & Burger, E. H. (2003) Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: A histological and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 759-766.

Tables

Table 1 – Characteristics of the study population

Group	AT				AL			
Patient	Age (years)	Gender (F/M)	Grafted blocks	Lost blocks	Age (years)	Gender (F/M)	Grafted blocks	Lost blocks
1	46	F	2	0	39	F	3	0
2	21	M	2	0	44	F	6	0
3	37	M	1	0	42	M	1	0
4	33	F	1	0	57	F	3	1
5	57	F	2	0	50	F	2	0
6	43	F	1	0	70	M	3	1
7	47	M	2	0	55	F	2	0
8	60	M	1	0	31	M	1	0
9	54	F	2	0	32	F	2	0
10	50	M	1	0	49	F	6	0
11	69	M	1	0	41	F	4	0
12	27	M	1	0	61	M	4	0
13	55	F	3	0	51	F	2	0
Averages / Totals	46	6/7	20	0	47	9/4	39	2

Table 2 – Characteristics of the study sample matched at the block level, securing the same number of blocks and the same regions in the patients in the AT and AL group

Block	Region	AT			AL		
		Age (years)	Gender (F/M)	CBCT Sections	Age (years)	Gender (F/M)	CBCT sections
1	Anterior maxilla	46	F	10	39	F	7
2	Anterior maxilla	46	F	10	39	F	10
3	Anterior maxilla	21	M	6	44	F	6
4	Anterior maxilla	21	M	8	44	F	8
5	Anterior maxilla	37	M	7	42	M	9
6	Anterior maxilla	33	F	9	57	F	12
7	Anterior maxilla	57	F	9	50	F	14
8	Anterior maxilla	57	F	9	50	F	13
9	Anterior maxilla	43	F	8	70	M	5
10	Anterior maxilla	47	M	9	55	F	12
11	Anterior maxilla	47	M	9	55	F	10
12	Anterior maxilla	60	M	8	31	M	8
13	Anterior maxilla	54	F	7	32	F	9
14	Anterior maxilla	54	F	8	32	F	10
15	Posterior maxilla	50	M	18	49	F	9
16	Posterior maxilla	69	M	8	41	F	9
17	Posterior maxilla	27	M	11	61	M	16
18	Posterior mandible	55	F	7	51	F	8
19	Posterior mandible	55	F	6	51	F	10
Averages / Totals		46	10/9	8.8	47	15/4	9.7

Table 3 – Averages, standard deviations and range for host bone area, grafted bone block area and TBA in mm² and CBA in %, in the AT and AL group.

Parameter	AT	AL
Host bone area (mm ²)	165.30 ± 54.14 (97.2 / 301.4)	140.20 ± 51.14 (50.0 / 216.9)
Grafted bone block area (mm ²)	24.19 ± 8.50 (6.9 / 38.4)	54.39 ± 20.95 (24.4 / 104.5)
TBA _{14d} (mm ²)	187.50 ± 56.65 (112.0 / 308.6)	194.10 ± 56.88 (93.6 / 271.8)
TBA _{6m} (mm ²)	195.00 ± 65.13 (98.8 / 322.7)	182.60 ± 56.07 (91.0 / 265.0)
CBA % (“Average”)	2.57 ± 14.62 (-32.6 / 32.1)	-9.33 ± 9.57 (-31.4 / 4.0)
CBA % (“Middle”)	-1.12 ± 19.22 (-39.4 / 32.9)	-8.35 ± 13.56 (-37.3 / 11.4)
CBA % (“Boundary”)	-2.75 ± 16.08 (-47.9 / 15.3)	-3.87 ± 11.97 (-33.8 / 18.7)

Figure legends

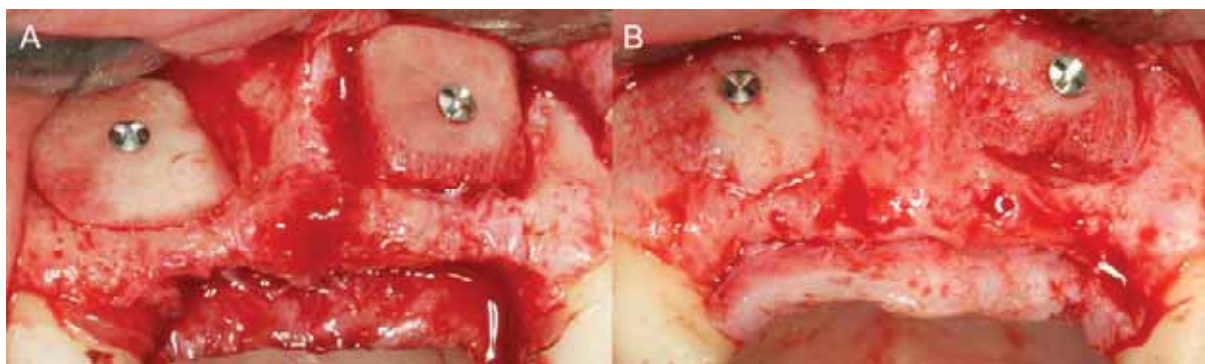


Figure 1 – A case treated with fresh-frozen bone allografts. The grafts just after fixation (A) and at the re-opening before implant placement 180 days after (B).

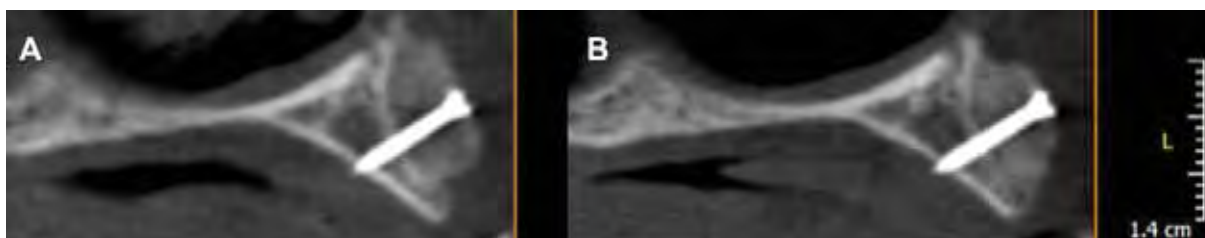


Figure 2 – Example of image sections for the AL group. The reproducibility of image sectioning plane in 14d (A) and 6m (B) is visible.

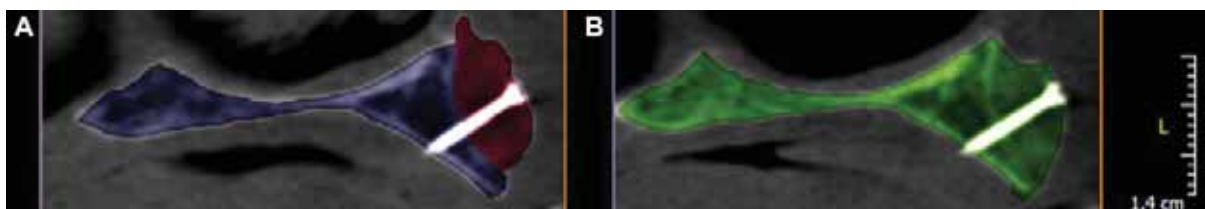


Figure 3 – Example of the measured areas in each image. At 14d (A), the host bone (in blue) and the grafted bone block (in red) areas were separately measured. At 6m (B) the total bone area (“TBA”, in green) was measured.

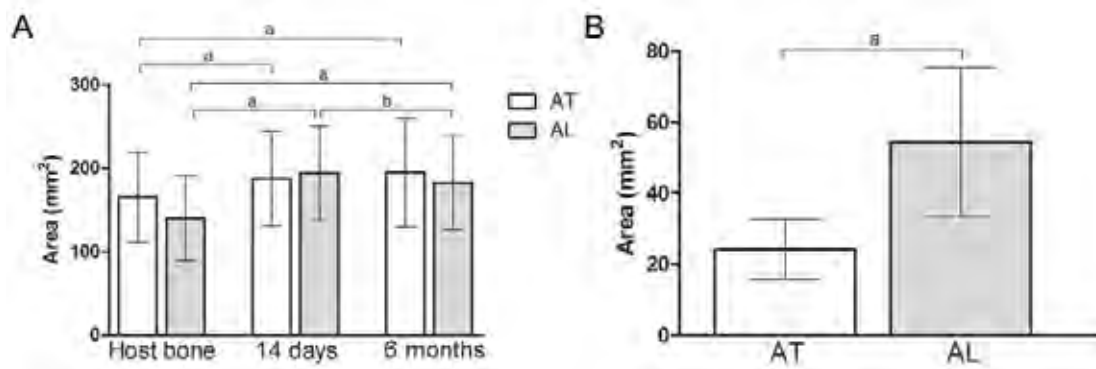


Figure 4 – (A) Bone area (mean $\pm$ SD, mm²) obtained using “Average”. (a) $p \leq 0.001$; (b) $p \leq 0.01$ **(B)** Initial area of the grafted bone block (mean $\pm$ SD, mm²) obtained using “Average”. (a) $p \leq 0.001$.

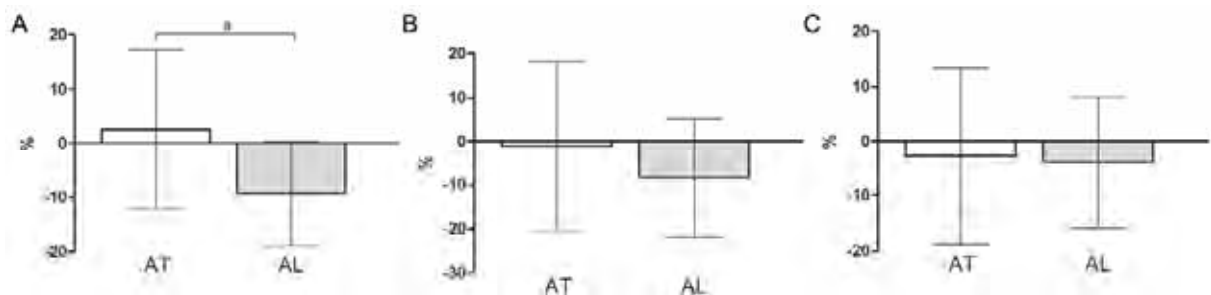


Figure 5 – CBA (mean $\pm$ SD, %), obtained **(A)** “Average”, **(B)** “Middle” and **(C)** “Boundary”. (a) $p = 0.0038$.

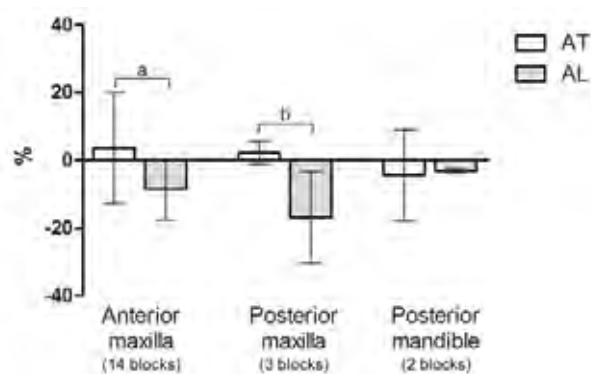


Figure 6 – CBA (mean $\pm$ SD, %) obtained using “Average” in the three grafted regions. (a) $p = 0.0155$ and (b) $p = 0.0801$, paired t -test.

Is Peripheral Blood Cell Balanced Altered by the Use of Fresh Frozen Bone Block Allografts in Lateral Maxillary Ridge Augmentation?

Rubens Spin Neto, DDS, MS;* Coletti Felipe Leite, DDS, MS;* Luis Antonio Violin Dias Pereira, MD, PhD;[†] Elcio Marcantonio, MS, PhD;[‡] Elcio Marcantonio Jr, MS, PhD[§]

ABSTRACT

Background: The relationship between the immune response and red and white blood cell homeostasis is cited in literature, but no studies regarding the balance of these cell populations following maxillary bone-graft surgeries can be found.

Aim: The aim of this study was to evaluate the possible impairments in the blood cell balance following fresh–frozen allogeneic bone-graft augmentation procedures in patients who needed maxillary reconstruction prior to implants.

Material and Methods: From 33 patients elected to onlay bone grafting procedures, 20 were treated with fresh–frozen bone allografts and 13 with autologous bone grafts. Five blood samples were collected from each patient in a 6-month period (baseline: 14, 30, 90, and 180 days postsurgery), and the hematological parameters (erythrogram, leukogram, and platelets count) were accessed.

Results: All evaluated parameters were within the reference values accepted as normal, and significant differences were found for the eosinophils count when comparing the treatments (30 days, $p = .035$) and when comparing different periods of evaluation (allograft-treated group, baseline $\times$ 180 days, $p \leq .05$ and 90 $\times$ 180 days, $p \leq .01$; autograft-treated group, 30 $\times$ 90 days, $p \leq .05$ and 30 $\times$ 180 days, $p \leq .05$).

Conclusions: Both autologous and fresh–frozen allogeneic bone grafts did not cause any impairment in the red and white blood cell balance, based on quantitative hemogram analysis, in patients subjected to maxillary reconstruction.

KEY WORDS: atrophic maxillae, autologous bone graft, blood cells, bone allograft, leucocytes, lymphocytes

INTRODUCTION

Adequate bone volume is one of the most important requirements to allow and maintain the osseointegration of implants throughout time and is directly

connected to high success rates in Implantology.¹ Several techniques have been used in an attempt to correct bone defects in the maxillo/facial complex because the availability of an adequate bone volume is normally diminished by local and systemic factors², which lead to the necessity of bone grafting procedures, in order to rehabilitate patient's stomatognathic system.³

Among these techniques, the autologous bone graft,⁴ both intra-⁵ and extraoral⁶, remains as the most predictable and best documented (and therefore considered as the gold standard) method for correcting this type of defect, showing advantages such as a rapid incorporation and consolidation, allied with a lack of immunologic considerations.^{7,8} This technique, however, is associated to some disadvantages, such as donor site morbidity, postsurgical pain, increased blood loss, paresthesia, hypersensitivity, infection, increased operative time, and sometimes deficiencies in the quality and

*PhD student, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil; [†]associate professor, Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas State University, Campinas, São Paulo, Brazil; [‡]professor, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery, Araraquara, São Paulo, Brazil; [§]professor, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Department of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil

Reprint requests: Mr. Rubens Spin Neto, Department of Periodontology, UNESP, São Paulo State University, Rua Humaitá, 1680 – CEP: 14801-903 – Araraquara-SP, Brazil; e-mail: netorubens@yahoo.com.br

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1111/j.1708-8208.2011.00385.x

quantity of available bone – providing an insufficient biomaterial volume⁹, which lead to the necessity of using other biomaterials to treat the bone defects.

One of the possible alternatives to autologous bone grafting is the use of fresh–frozen bone allografts because it provides a reasonable source for grafting material.¹⁰ Advantages such as ease of obtaining, reduced surgical time, and the absence of a second surgical area makes this biomaterial, obtained from bone–tissue banks, a viable way to achieve the desired bone volume prior to rehabilitation with dental implants.¹¹

Since the first clinical report of allograft use in humans, there is a range of almost 130 years, and during the last two decades, its use has increased significantly.¹² In comparison with the autologous bone, fresh–frozen bone allografts remodeling is slower, and the union between the recipient bed and the graft is achieved consistently given that this biomaterial acts as a platform for new bone formation, preferentially as a osteoconductive scaffold.^{13,14} The increased use of allogeneic bone is directly linked to the establishment of severe guidelines for bone processing, which defined the protocols to work with this biomaterial^{15,16} and augmented the safety of its use, with no reports of cross-contamination, mainly considering diseases such as hepatitis or human immunodeficiency virus (HIV).¹⁷

Another concern with bone allograft is its antigenicity, but there is still limited information regarding this issue.¹⁸ Some studies tried to state the relationship between the immune system and the fate of bone grafts. Eventhough intuition demanded and experimentation confirmed that bone allografts, like any other tissue and organ allografts, are immunogenic, the magnitude and the consequences of this information is still unclear.^{19,20} According to literature, when antigen-matched grafts are used, more bone-forming surface can be seen, while the amount of bone resorbing surface is not altered.²¹ Allied to this information, there is the fact that, although the relationship between the immune response and red and white blood cells homeostasis is cited in literature,^{22,23} no studies regarding the balance of these cell populations following maxillary bone-graft surgeries can be found.

Using a quantitative evaluation of the red and white blood cell lineage count in patients who needed maxillary reconstruction prior to implants placement, the purpose of this study was to evaluate if fresh–frozen allogeneic bone grafts would invoke impairments in the

blood cell balance when compared with autogenous bone grafts.

MATERIALS AND METHODS

This research protocol was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee and by the National Research Ethics Committee under the protocol number 36/08, and it is in accordance to the World Medical Association Declaration of Helsinki (2002).

Patient Selection

The sample of this study is composed of 33 patients, 12 male and 21 female, with an average age of 47 years (ranging from 27 to 69), who presented for oral rehabilitation with titanium implants at the Department of Periodontology from Araraquara Dental School (UNESP – Universidade Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil, between May 2009 and December 2009. Patients with habits or systemic conditions that could confessedly interfere in bone grafts remodeling or in the implants osseointegration, such as smoking, alcoholism, drugs usage, or clinical and tomographic signs of maxillofacial lesions that contraindicate these elective surgeries were automatically dismissed.

Patients presenting severe bone deficiencies (width inferior to 4 mm in the sites which implants were planned, evaluated using computed tomography examination) were elected to onlay bone grafting procedures prior to implant placement (Figure 1). According to ethical guidelines, the patient treated with allogeneic bone grafts need to be informed and consent with the treatment; groups were not randomized. As the autologous bone grafting is the actual gold standard, only patients who presented an absence of a convenient amount of donor bone, which forbid the utilization of autologous bone grafts, or in cases that the cost-benefit effect of an autograft does not meet the willingness of the patient were treated with allografts. In this way, 20 patients were treated with allogeneic bone grafts and 13 with autologous bone grafts in a total of 64 and 22 bone blocks, respectively. In both groups, approximately 85% of the patients had the grafts made in the maxilla.

At the presurgical phase, when the patient's indication to each of the proposed protocols was already determined, all the documents regarding the biomaterial request were filled and sent to the registered bone bank that supplied the patients from allograft group (UniOss, Marília, Brazil). The allograft bone was processed



Figure 1 Initial clinical situation, occlusal (A) and buccal (B) view, showing the absence of an adequate bone volume to allow the installation of dental implants.

according to AATB guidelines²⁴ and delivered the day before the surgeries were made.

Surgical Procedures

Subjects were asked to wash their mouths using a 0.12% chlorhexidine rinse for 1 minute right before the procedure starts. Complimentary to this, a Povidone–iodine 10% solution was applied to the perioral skin to prevent contamination. During the first surgical phase and under local anesthesia, a total flap was attained in such a way to provide a full visualization of the bone defect. Any reminiscent of soft tissues were removed from bone surface, and delicate burs were used, always under intense saline solution irrigation, to etch the host cortical bone allowing the vascularization to occur in an easier way toward the grafts (Figure 2).

In the group treated with autologous bone, the cortico-cancellous grafts were retrieved from the mandible ramus according to the size of the defect to be

treated. In the group treated with the allografts, at the time of the surgery, the cortico-cancellous bone blocks were removed from the freezer and put into sterile saline solution for 10 minutes allowing them to hydrate and get to room temperature gradually. Both types of blocks were then prepared with careful trimming using #700 cylindrical and maxi-cut burs, always under abundant sterile saline solution irrigation, and adjusted to the host bone. The blocks were fixated to the host bone using 1.5×10 mm or 1.5×12 mm screws (Neodent, Curitiba, Brazil) and covered by a collagen membrane (Genius Baumer, São Paulo, Brazil) prior to the suture, made with interrupted nylon 4-0 simple points (Figure 3). All patients were medicated using antibiotics (amoxicillin 500 mg three times daily for 7 days), nonsteroidal anti-inflammatory (nimesulide 100 mg two times daily for 5 days), and analgesics (acetaminophen 750 mg 4 times daily when there was pain), and the sutures were removed 14 days after surgery.



Figure 2 Surgical sequence used in the bone-graft procedure. (A) The bone berth after the total flap attainment and (B) cleaned from all soft tissues, scratched and prepared to receive the graft.

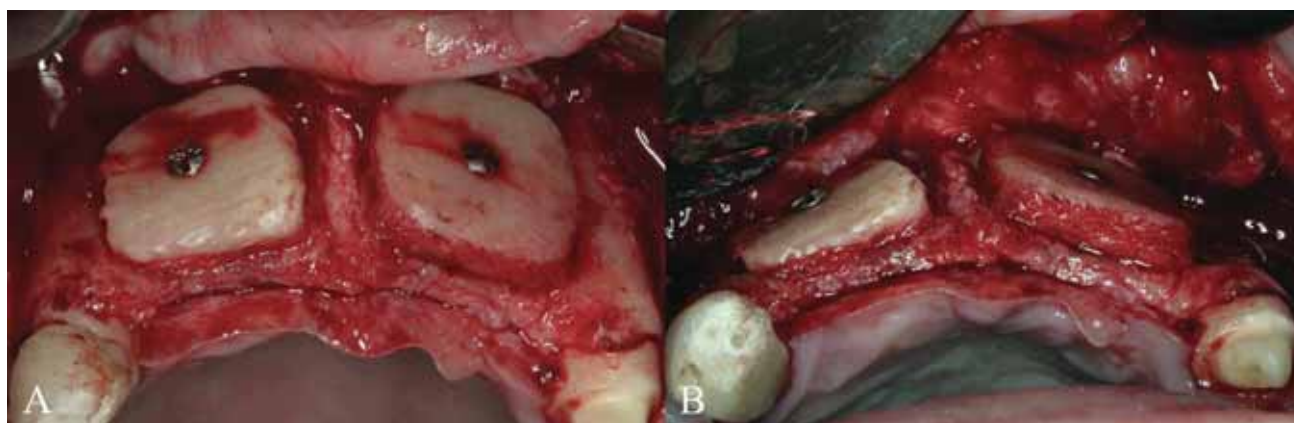


Figure 3 A buccal (A) and occlusal (B) view of the grafts after their installation with fixation screws and adjustments of the borders.

Blood Sample Collection and Processing

All 33 patients have five blood samples collected in a 6-month period. The first sample was collected 7 days prior to the grafting surgery (baseline), and the four subsequent were collected at the 14th, 30th, 90th, and 180th postsurgery. The last blood sample (180th day) was collected in order to evaluate the patient prior to the titanium implants placement.

Blood samples were collected under standardized conditions: 2.0 mL of total venous blood was collected in vacuum tubes containing EDTA/K3 to determine hematological parameters. Blood samples were collected in the morning after 12 hours of fasting in a seated position, transported at 4°C to the laboratory within 30 minutes, centrifuged under refrigeration at 1,800 g for 10 minutes immediately separated and protected from light.

Hematological analyses were conducted using a Cobra Micro automated hematology analyzer (Roche Pharma Ltd., Reinach, Switzerland). The analyses included red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, erythrocyte distribution width, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration. White blood cell, normal and abnormal lymphocyte, monocyte (M), eosinophils (E), segmented cells, and platelet (PLT) count were also performed using the same automated analyzer.

Data Analysis

Descriptive analysis of data was expressed as means and standard deviations. A commercially available software (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software

Inc., La Jolla, CA, USA) was utilized to compare means and draw the graphics. Data was subjected to normality test analysis (D'Agostino & Pearson). Parametric data was evaluated using analysis of variance followed by Bonferroni posttest for multiple comparisons, and *t*-test was used for paired comparisons. Evaluation of nonparametric data was made using Kruskal–Wallis followed by Dunns' posttest or Mann–Whitney test. Statistical significance was set at 5% ($p < .05$).

RESULTS

During the 180 days evaluation period, the problems related to the surgeries were one exposed graft, at the 30-day period in the allograft-treated group, and four loosened blocks, three in the allograft-treated group (4.69%) and one in the autograft-treated group (4.55%). The patient with the exposed block was instructed to apply chlorhexidine 1% gel over the exposed area twice a day for 14 days, and after that the graft was again covered by soft tissue. The four patients with loosened blocks removed these blocks at the moment of implant placement, and their treatment plan was changed, with new grafts being performed in those sites. These patients were maintained in the study sample because they all had more than one block grafted, and the samples used for the hematological evaluation had already been collected.

Regarding the data from the hematological analyses, only the M and E counting returned a nonparametric data distribution. All other evaluated data were considered as parametric. In the erythrogram, all evaluated parameters were within the reference values accepted as normal, and no statistically significant differences

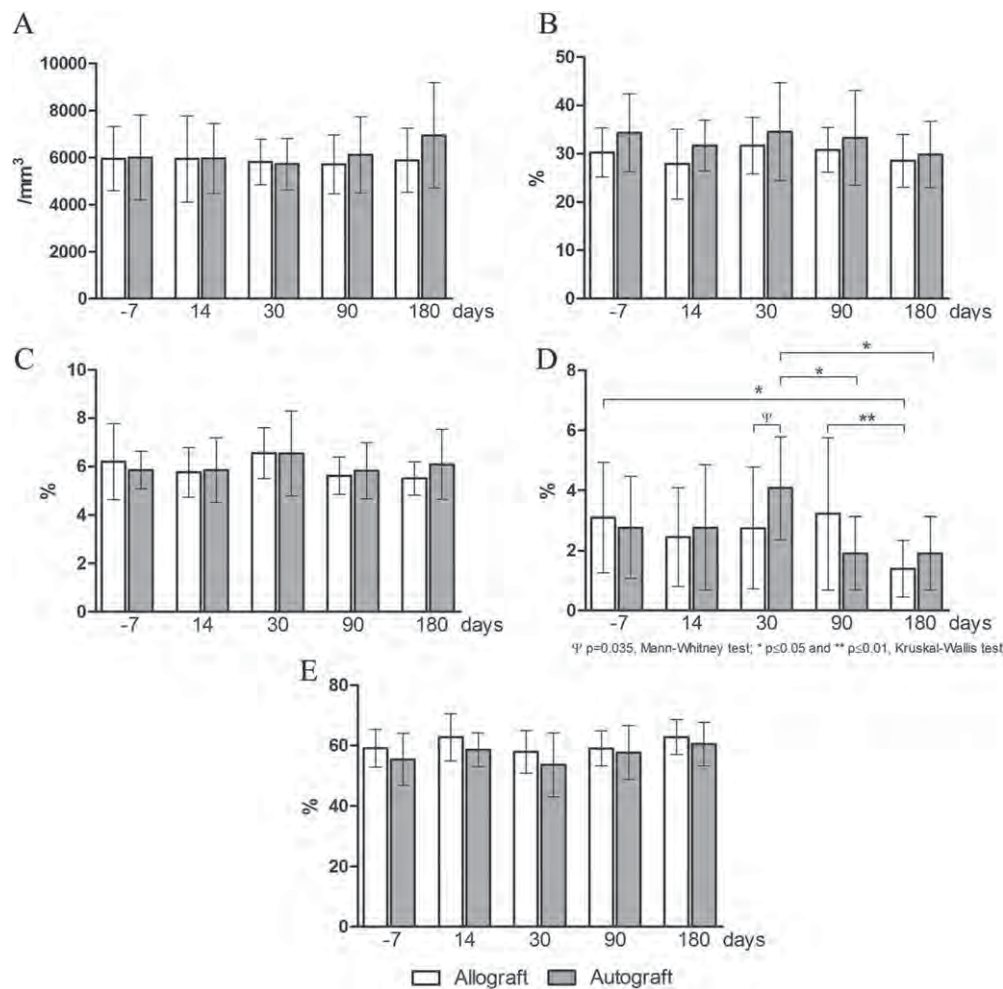


Figure 4 Leukogram data expressed in means and standard deviations: (A) white blood cells (/mm³); (B) normal lymphocytes (%); (C) monocytes (%); (D) eosinophils (%); and (E) segmented cells (%).

between autograft and allograft groups, in all observed periods, could be found (Table 1).

In the leukogram (Figure 4A–E; see Table 1), all evaluated parameters were also within the reference values accepted as normal, and statistically significant differences were found only for the E count, between the autograft and allograft groups (only in the 30-day evaluation period, $p = .035$ – Mann–Whitney test), and in the same group, when comparing the different periods of evaluation. For the allograft group, differences were found when comparing baseline $\times$ 180 days ($p \leq .05$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s posttest) and 90 $\times$ 180 days ($p \leq .01$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s posttest), while in the autograft group, differences were found when comparing 30 $\times$ 90 days ($p \leq .05$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s posttest) and 30 $\times$ 180 days ($p \leq .05$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s posttest). No abnormal lymphocytes were found in any of the evaluated patients.

In the PLT evaluation, the values were also within the reference, and no statistically significant differences between both groups and periods of evaluation were found (Figure 5; see Table 1).

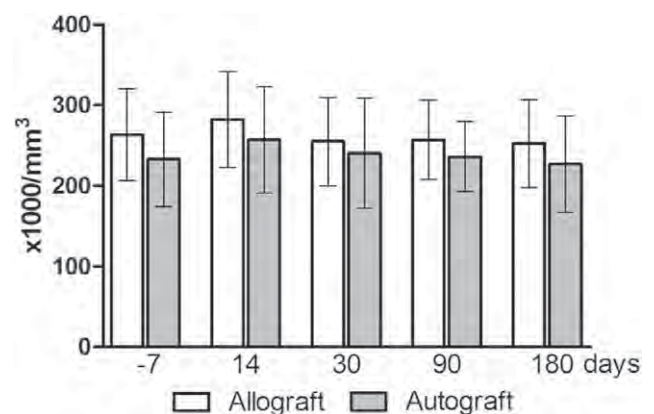


Figure 5 Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$) expressed in means and standard deviations.

TABLE 1 Erythrogram, Leukogram, and Platelet Count Data, Expressed in Means and Standard Deviations

Variable	Baseline		14 Days		30 Days		90 Days		180 Days	
	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft
Erythrogram										
RBC	4.65 ± 0.52	4.86 ± 0.40	4.63 ± 0.45	4.69 ± 0.46	4.67 ± 0.40	4.77 ± 0.47	4.58 ± 0.52	4.74 ± 0.38	4.62 ± 0.42	4.81 ± 0.48
Hb	13.49 ± 1.55	13.74 ± 1.44	13.53 ± 1.39	13.25 ± 1.23	13.60 ± 1.49	13.49 ± 1.50	13.34 ± 1.31	13.70 ± 1.56	13.58 ± 1.31	13.37 ± 1.76
Ht	41.01 ± 4.23	42.45 ± 3.57	40.83 ± 3.76	40.54 ± 3.44	41.25 ± 4.08	41.48 ± 4.12	40.10 ± 4.05	40.80 ± 4.44	40.87 ± 3.62	40.83 ± 1.34
MCV	88.35 ± 4.93	87.55 ± 5.57	88.26 ± 4.76	86.75 ± 5.43	88.44 ± 5.13	87.00 ± 4.91	87.80 ± 4.93	85.98 ± 5.21	88.60 ± 3.91	88.42 ± 4.68
RDW	13.24 ± 0.87	12.95 ± 1.08	13.11 ± 0.87	13.01 ± 0.98	13.15 ± 0.84	13.30 ± 1.01	13.27 ± 1.43	13.06 ± 0.98	13.13 ± 0.87	13.45 ± 1.08
MCH	29.08 ± 2.26	28.31 ± 2.23	29.23 ± 1.64	28.39 ± 2.55	29.13 ± 2.05	28.26 ± 1.81	29.24 ± 2.02	28.71 ± 2.20	29.41 ± 1.29	28.26 ± 2.04
MCHC	32.83 ± 0.98	32.32 ± 1.18	33.12 ± 0.83	32.70 ± 1.11	32.94 ± 1.19	32.52 ± 0.88	33.28 ± 0.91	33.40 ± 0.98	33.20 ± 0.76	32.68 ± 1.14
Leukogram										
WBC	5955 ± 1357	6008 ± 1796	5945 ± 1837	5969 ± 1486	5810 ± 971	5723 ± 1093	5711 ± 1251	6118 ± 1624	5890 ± 1363	6945 ± 2239
NL	30.25 ± 5.11	34.31 ± 8.10	27.85 ± 7.23	31.69 ± 5.27	31.65 ± 5.82	34.54 ± 10.13	30.78 ± 4.62	33.27 ± 9.78	28.50 ± 5.48	29.82 ± 6.84
M	6.20 ± 1.57	5.86 ± 0.77	5.75 ± 1.02	5.84 ± 1.34	6.55 ± 1.05	6.53 ± 1.76	5.61 ± 0.78	5.82 ± 1.17	5.50 ± 0.69	6.09 ± 1.45
E	3.10 ± 1.83	2.77 ± 1.69	2.45 ± 1.64	2.76 ± 2.09	2.75 ± 2.02	4.08 ± 1.71	3.22 ± 2.53	1.91 ± 1.22	1.40 ± 0.94	1.91 ± 1.22
SC	59.10 ± 6.28	55.46 ± 8.58	62.75 ± 7.78	58.62 ± 5.63	57.90 ± 7.05	53.62 ± 10.57	59.06 ± 5.79	57.64 ± 8.92	62.85 ± 5.74	60.45 ± 7.17
Platelets (×10 ³ /mm ³)	263.4 ± 57.0	232.7 ± 58.6	282.4 ± 59.6	257.0 ± 65.9	255.1 ± 54.7	240.5 ± 68.5	256.9 ± 48.8	236.3 ± 43.6	252.4 ± 54.3	226.9 ± 60.0

RBC = red blood cells (millions/mm³); Hb = hemoglobin (g/dl); Ht = hematocrit (%); MCV = mean corpuscular volume (u³); RDW = erythrocyte distribution width (%); MCH = mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl); WBC = white blood cells (/mm³); NL = normal lymphocytes (%); M = monocytes (%); E = eosinophils (%); SC = segmented cells (%).

DISCUSSION

Allogeneic bone grafts are one of the most frequently chosen bone substitutes and, in the last decade, its use as the surgeon's second option has increased 15-fold and already accounts for about one-third of bone grafts performed in the United States if we consider its use in dentistry and orthopedics.^{25–27} Besides that, bone graft is the second most common transplantation tissue, with blood being the most common.²⁷ Associated to bone allografts, literature cites advantages such as convenience for the surgeon, decreased operative trauma for the patient, a theoretically unlimited supply of reconstructive material, allied to decreased blood loss, absence of donor site morbidity, and decreased operative time.²⁸

The most cited disadvantages regarding the use of bone allografts are the different biological properties when compared with bone autografts²⁷ and its possibility of antigenicity and the risk of disease transmission¹⁶. There is a wide range of studies stating that bone allografts represent a minimal risk to the patient regarding diseases transmission and cross-contamination, if we consider bone-tissue banks that are based into the AATB standard protocols.⁴ According to the literature, the risk of viral transmission using unprocessed deep-frozen, non-irradiated grafts from screened donors is currently less than 0.0005% for HIV and hepatitis C.²⁹

The antigenicity of these allografts is a major interest issue. The lack of information regarding specific characteristic shows up as a concern for clinicians and researchers seeking for the reasons of the different biological properties of allografts when compared with bone autografts.¹⁸ It is important to highlight that bone allografts are frequently considered as a universal donor material, which has the immunologic potential diminished by the processing of the tissue (mainly the removal of the cells and the deep-freezing procedures), despite the lack of information on this issue.^{20,30,31}

One evaluation method, which could bring information in this issue, would be the screening of the blood cell profile of patients who went through bone grafting surgery. The analysis of blood constituents allows the detection of various physiological or pathological states when their values are increased or decreased in relation to a well-defined reference group or to themselves if monitored longitudinally.³² In this aim, special attention must be given to the white cell profile of the patients

because cells such as the lymphocytes could be directly connected to any current foreign-body reaction toward the grafted material.³³

Literature states bone allograft as a material that does not provoke severe marked immune responses and has acceptable compatibility with the recipient site, although there are no long-term studies regarding this issue.³⁴ However, experimental studies, mainly in animals, and using major-size grafts shows that transplanted fresh-frozen allografts can elicit an immunologic response in the host; although the clinical significance of this is still unclear.^{20,21,30,31} In our study, and in agreement with current information, all treated patients presented good systemic health after the bone grafting procedures, without any signs of contamination or immunological incompatibility problems.

Although the relationship between the immune response and red and white blood cells homeostasis is cited in literature,^{22,23} we could not find literature researches regarding the blood count profile through time in patients after bone grafting in the maxillo/facial region. In our study, all evaluated parameters were within the reference values accepted as normal, in erythrogram, leukogram, and PLT profile. Normally, these types of study mainly look for the antibodies that can be produced toward the grafts rather than the alterations that can be caused in the white blood cell count, such as the study of Friedlander,³⁵ in which graft-specific anti-human leukocyte antibodies were identified in the sera of nine of 44 patients who had received freeze-dried massive allografts but without present poor clinical results.

In our study, statistically significant differences comparing the groups were found only for the E count (30 days, $p = .035$, Mann-Whitney test). The concept that the eosinophil functioned in tissue repair was supported by results showing that E and their products neutralized mast cell-derived mediators of anaphylaxis.^{36,37} However, a direct test of this hypothesis did not show any difference between the severity of hypersensitivity reactions in the presence and absence of the E.^{36,38} Allied to that, our results regarding the comparison between the different periods in the same group also showed some differences in the autograft group, making clear that this statistical significant result is not direct related to any antigenicity miscarriage in the allografts. The high standard deviations that we had in this exam could have influenced this result.

The differences found for E count can also be connected to the bone healing and angiogenesis that was undergoing in the grafted region. The literature shows that E can interfere in angiogenesis through the eosinophil-derived major basic protein pathway. The production of vascular endothelial growth factor and of other pro-angiogenic factors, such as basic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor alpha, granulocyte macrophage colony stimulating factor, nerve growth factor, and interleukin-8, has suggested a strong link between E and angiogenesis.³⁹

The normal levels of lymphocyte and the absence of abnormal lymphocytes that were seen are also a good predictive that no significant ongoing inflammatory processes were related to the grafts; although more specific studies, based on interleukins detection, should be addressed to definitively clarify this point.⁴⁰ This goes toward the information that, like any other tissue allograft, fresh–frozen bone allografts should be immunogenic, but the real significance and impairments cause by these events are still unclear.^{19,41} In this regard, it has been showed that the administration of immunosuppressive drugs in the host could improve bone allograft performance,^{21,42} although the interference of these drugs usage on the systemic health from the recipient could be an major disadvantage.³¹

Important consideration about our results is the fact that the chosen periods of evaluation, beginning 14 days after the grafting surgery, did not include any evaluation of the “immediate” cellular responses to the grafts, which could have occurred earlier (e.g., in the first 7 days). Studies focusing on the first days of interaction between the host bone and the grafted material would be necessary to understand if our results represent the full of the cellular alterations that occur following the bone grafting procedures, or if there are other early variations that could be important to understand the fate of these grafts. So far, specific literature did not address to that.

Allied to that, further long-term studies are needed to elucidate biological events related to bone allografting in the maxillo/facial region, mainly because besides the potential consequences of local graft rejection, the implications of sensitization of the host to an expanded pool of human leukocyte antigen antigens also should be considered, even limiting the options for subsequent tissue transplants.²⁰ The remodeling process of these grafts and the success rates of implants and implant-supported prosthesis installed over them also have to be

accessed to long term, providing evidence that could support this therapeutic option. Our study clarifies that peripheral blood cell balance is unaltered by the use of fresh–frozen bone allografts or autogenous bone block grafts in lateral maxillary ridge augmentation.

CONCLUSION

Considering these results and based on the limitations of the evaluation model that was used, it is concluded that both autologous and fresh–frozen bone allografts did not cause any impairment in the red and white blood cell balance, based on quantitative hemogram analysis, in patients subjected to maxillary reconstruction.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2008/09207-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

REFERENCES

1. Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y, Tsuru H. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study. *J Prosthet Dent* 1992; 68:813–816.
2. Wiens JP. The use of osseointegrated implants in the treatment of patients with trauma. *J Prosthet Dent* 1992; 67:670–678.
3. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics* 1994; 17:809–810, 821.
4. Contar CM, Sarot JR, Bordini J, Jr, Galvao GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1280–1285.
5. Nowzari H, Aalam AA. Mandibular cortical bone graft part 2: surgical technique, applications, and morbidity. *Compend Contin Educ Dent* 2007; 28:274–280.
6. Donovan MG, Dickerson NC, Hanson LJ, Gustafson RB. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:588–594.
7. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:187–196.
8. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics* 2004; 27:488–495.
9. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent* 2003; 12:217–226.
10. Collins M, James DR, Mars M. Alveolar bone grafting: a review of 115 patients. *Eur J Orthod* 1998; 20:115–120.

11. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:69–86.
12. Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank* 2000; 1:105–109.
13. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64:270–279.
14. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990; 14:243–248.
15. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:15–21.
16. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:333–335.
17. Bui MM, Smith P, Agresta SV, Cheong D, Letson GD. Practical issues of intraoperative frozen section diagnosis of bone and soft tissue lesions. *Cancer Control* 2008; 15:7–12.
18. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989; 24:891–905.
19. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69:786–790.
20. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371:10–27.
21. Stevenson S, Li XQ, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73:1143–1156.
22. Esposito S. Immune system and surgical site infection. *J Chemother* 2001; 13 Spec No 1:12–16.
23. Maggini J, Raiden S, Salamone G, Trevani A, Geffner J. Regulation of neutrophil apoptosis by cytokines, pathogens and environmental stressors. *Front Biosci* 2009; 14:2372–2385.
24. American Association of Tissue Banks. 16th Annual meeting. August 24–26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993; 33:610–621.
25. Bridwell KH, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C, Blanke K. Posterior spinal fusion supplemented with only allograft bone in paralytic scoliosis. Does it work? *Spine* 1994; 19:2658–2666.
26. Carter G. Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J* 1999; 70:660–670.
27. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 (Suppl 3):S20–S27.
28. Perrott DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 21:260–265.
29. Albert A, Leemrijse T, Druez V, Delloye C, Cornu O. Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study of bone grafting. *Acta Orthop Belg* 2006; 72:734–740.
30. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:571–581.
31. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005; 16:981–989.
32. Nunes LA, Brenzikofer R, de Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110:191–198.
33. Murray CA, DeKoven J, Spaner DE. Foreign body granuloma: a new manifestation of immune restoration syndrome. *J Cutan Med Surg* 2003; 7:38–42.
34. Stevenson S, Li XQ, Davy DT, Klein L, Goldberg VM. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79:1–16.
35. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:58–68.
36. Bochner BS, Gleich GJ. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:16–25.
37. Goetzl EJ, Wasserman SI, Austen F. Eosinophil polymorphonuclear leukocyte function in immediate hypersensitivity. *Arch Pathol* 1975; 99:1–4.
38. Gleich GJ, Olson GM, Loegering DA. The effect of ablation of eosinophils on immediate-type hypersensitivity reactions. *Immunology* 1979; 38:343–353.
39. Puxeddu I, Berkman N, Nissim Ben Efraim AH, et al. The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy* 2009; 64:368–374.
40. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:232–241.
41. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty* 1993; 4:58–63.
42. Welter JF, Shaffer JW, Stevenson S, et al. Cyclosporin A and tissue antigen matching in bone transplantation. Fibular allografts studied in the dog. *Acta Orthop Scand* 1990; 61:517–527.

Immune implications of autologous and fresh-frozen allogeneic bone grafting used for ridge augmentation. A systemic analysis.

Rubens Spin-Neto, MSc^a; Rubens Moreno de Freitas, DDS^a; Luís Antônio Violin Dias Pereira, PhD^b; Iracilda Zeppone Carlos, PhD^c; Elcio Marcantonio Jr, PhD^a.

^aDepartment of Periodontology, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Histology and Embryology, UNICAMP – State University of Campinas, Institute of Biology, Campinas, São Paulo, Brazil.

^cDepartment of Clinical Analysis, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara Pharmaceutical Sciences School, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Running title: Immune implications of bone grafting

Key-words: *Bone allograft; bone autograft; ridge augmentation; ELISA; Immunological evaluation.*

Corresponding author:

Rubens Spin Neto

Department of Periodontology - UNESP, São Paulo State University

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14801-903 - Araraquara-SP, BRAZIL

Fax: 55-16-3301-6369/3301-6378

E-mail: netorubens@yahoo.com.br

Immune implications of autologous and fresh-frozen allogeneic bone grafting used for ridge augmentation. A systemic analysis.

Abstract

Background: Although there is an increase in the use of fresh-frozen allogeneic bone grafts, in substitution to autologous bone grafting, there are still concerns regarding the antigenicity and immunogenicity of allografts. **Purpose:** to evaluate the systemic immune impact of fresh-frozen allogeneic bone grafts, compared to autologous bone grafts, based on a quantitative evaluation of IL-10, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α in patients sera. **Material and methods:** Thirty-three partially or totally edentulous patients treated either with fresh-frozen allogeneic bone (AL – 20 patients) or autologous bone onlay block grafts (AT – 13 patients) prior to dental implant placement, were included in this analysis. Five blood samples were collected from each patient in a 6 month-period (baseline, 14, 30, 90 and 180 days post grafting) Immunological analyses of the sera were conducted through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IL-10, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α . **Results:** For all evaluated markers, and in all evaluated periods, inter-group comparison showed statistically similar results for both groups. For AL-treated patients, intra-group evaluation showed statistically significant ($p < 0.01$) increase in the IL-1 β level from baseline to 30 days, allied to a TNF- α increase ($p < 0.001$) from baseline to 90 and 180 days, and a IFN- γ decrease from baseline to 14 days ($p < 0.05$), increase from 14 to 90 days ($p < 0.001$) and decrease from 90 to 180 days. No intra-group differences were seen for AT group. **Conclusions:** Both autologous and fresh-frozen allogeneic bone grafts did not negatively influenced the systemic levels of the evaluated markers, although the clinical impact of the intra-group differences found for AL-treated group must be investigated in further studies.

Introduction

Adequate bone volume is a “*sine qua non*” condition for the installation of dental implants in the correct three-dimensional position, allowing the placement of correct sized implants, facilitating the maintenance of osseointegration over time and increasing the success rates of implant therapy.¹⁻⁴ Local and systemic factors normally lead the available bone volume to be diminished⁵ and therefore, to enable the oral rehabilitation of the patient, reconstructive techniques such as bone grafting, must be engaged to restore bone anatomy.⁶⁻⁹

Grafting procedures based on the use of autologous bone remain the best documented method, considered so far as the gold standard technique for bone augmentation.¹⁰⁻¹⁵ Although connected to advantages such as rapid incorporation and consolidation^{16, 17}, and a lack of immunologic considerations¹⁸, there are disadvantages, mainly connected to the donor site, which go ahead of the necessity of finding alternative materials to treat the bone deficiencies.¹⁹⁻²¹

Literature is rich in suggesting alternatives for autologous bone grafting²²⁻²⁴, and one of the alternatives that have been raising scientists attention in the last years is the use of fresh-frozen allogeneic bone grafts.^{6, 7, 21, 25-29} This technique is allied to advantages such as ease of obtaining, reduced surgical time – due to the absence of a second surgical area – and availability (since the necessary amount can be obtained from certified bone-tissue banks), which make it a viable clinical alternative.^{25, 30}

Compared to the gold standard, literature shows poorer biological outcomes for fresh-frozen allogeneic bone grafts, such as slower remodeling and an exclusively osteoconductive action^{31, 32}, and a reduced implant osseointegration

success-rate³³, although there is still a lack of standardized, long-term, human studies.^{31, 32, 34}

Although the increased use of allogeneic bone is directly linked to the establishment of severe guidelines for bone processing, defining the protocols to work with this biomaterial^{35, 36} and which increased the safety of its use (no reports of crossed-contamination, considering diseases such as hepatitis or HIV, have been reported so far, and the risk of disease transmission is considered low)^{20, 37}, there are still concerns regarding the antigenicity and immunogenicity of allografts.³⁸

The relationship between the immune system and the fate of bone grafts remains a nearly unexplored issue in literature, and the influence of the immune response on bone-graft remodeling lingers imprecise.^{39, 40} There is the suggestion that fresh-frozen bone grafting does not systemically influence immune response, based on red and white blood cells population homeostasis⁴¹ - the relationship between the immune response homeostasis is cited in literature^{42, 43} – although no evidence based on systemic immune markers, such as interleukins and inflammatory cytokines, are available so far.

Based on a quantitative evaluation of interleukins 10 (IL-10) and 1 β (IL-1 β) and the inflammatory markers interferon γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in patients who needed maxillary reconstruction prior to dental implants placement, the purpose of this study was to evaluate the systemic immune impact of fresh-frozen allogeneic bone grafts, compared to autologous bone grafts.

Materials and Methods

The research protocol of this controlled case series was approved by the Araraquara School of Dentistry Ethics Committee (CEP-FO/Car) and by the National Research Ethics Committee (CONEP-MS) under the protocol number 36/08, and it is in accordance to the World Medical Association Declaration of Helsinki (2002). All treatments were performed in the Department of Periodontology, Araraquara Dental School (UNESP – Univ. Estadual Paulista), Araraquara, São Paulo, Brazil.

Patient selection

A total of 33 partially or totally edentulous patients 12 male and 21 female, with an average age of 47 years (ranging from 27 to 69), who desired oral rehabilitation with titanium implants and had at least one site with severe bone deficiency (i.e., <4 mm alveolar ridge width) not allowing the direct placement of a regular size implant, were treated from May to December 2009. Alveolar ridge width was determined on the cross-sectional image section view of CBCT (i-CAT Classic, Imaging Sciences International, USA) generated images (DICOM-based data sets) with a resolution of 96 dpi, 14-bits gray scale and 0.25 mm voxel size. The CBCT unit was set at 120 kVp, 5 mA, with a 20 sec. exposure time. None of the patients presented with systemic diseases affecting bone turnover, or were pregnant or lactating, or had habits that could interfere with treatment (for example: smoking, alcoholism and drug use).

Patients were not randomly assigned to each of the used grafting materials, and therefore groups were not randomized, since according to ethical guidelines the patient treated with fresh-frozen allogeneic bone grafts need to be informed and

consent with the treatment. As the autologous bone-grafting is the actual gold-standard, only patients judged not to possess adequate amounts of donor (autologous) bone were treated with fresh-frozen bone allografts. This decision was taken based on the clinical screening examination and the CBCT examination and depended on the amount of bone resorption and/or number of sites requiring reconstruction in each patient. Thus, 20 patients were treated with fresh-frozen allogeneic bone grafts (AL) and 13 with autologous bone grafts (AT). In both groups, approximately 85% of the patients had the grafts made in the maxilla.

Following Brazilian regulations, documents regarding the allogeneic biomaterial request were filled-out and sent to the registered bone bank that supplied the allografts (UniOss, Marília, Brazil). The fresh-frozen allogeneic bone was collected and processed according to the American Association of Tissue Banking guidelines – AATB.⁴⁴

Surgical procedures for bone grafting

Immediately prior to the augmentation surgery, all patients performed a mouth rinse with 10-15 ml 0.12% chlorhexidine digluconate for one minute and povidine-iodine 10% solution was applied to the peri-oral skin.

Under local anesthesia a full thickness flap was raised to provide a full visualization of the alveolar ridge. Any reminiscent soft tissues were removed from the bone surface, and delicate burs were used under intense saline solution irrigation to penetrate the host cortical bone for enhancing vascularization towards the base of the grafts. In the AT group, grafts of adequate size according to defect dimensions were retrieved from the mandibular ramus. In the AL group,

standard size cortico-cancellous bone blocks (15 x 10 x 6 mm) were removed from the freezer and put into sterile saline solution for 10 minutes, allowing them to hydrate and obtain room temperature gradually. Both types of blocks were trimmed to fit the defects using cylindrical and maxi-cut burs under abundant sterile saline solution irrigation. The blocks were fixed with the cancellous bone side facing the host bone using 1.5 mm in Ø x 10 or 12 mm long titanium screws (Neodent, Curitiba, Brazil) and covered by a collagen membrane (Genius Baumer, São Paulo, Brazil). Finally, the flaps were repositioned to cover the grafts completely and were sutured with interrupted nylon 4-0 single sutures.

Figure 1 exemplifies clinical situations of both treated groups.

As a post-surgical protocol, all patients received antibiotics (Amoxicillin 500 mg) three times daily for seven days, non-steroidal anti-inflammatory treatment (Nimesulide 100 mg) two times daily for five days, and analgesics (Acetaminophen 750 mg) according to individual needs. Patients continued to rinse with chlorhexidine digluconate for the following 7 days. Sutures were removed 14 days after surgery.

Sera collection and evaluation

All 33 patients have 5 blood samples collected in a 6 month-period, from which sera were separated. The first sample was collected 7 days prior to the grafting surgery (baseline), and the 4 subsequent samples were collected at the 14th, 30th, 90th and 180th post bone grafting.

Blood samples were collected under standardized conditions, and 5.0 mL of total venous blood was collected in vacuum tubes containing EDTA/K3, at each time period, for each patient. Blood samples were collected in the morning after 12 h

of fasting, in a seated position, transported at 4°C to the laboratory within 30 min, centrifuged under refrigeration at 1800 g for 10 min, for sera separation. Separated sera were then inactivated (placed into a 56°C bath for 30 minutes), and separated in 350 µL samples, identified and frozen at -80°C, until the moment the immunoassays were realized.

Immunological analyses were conducted through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using specific reagent-set kits (BD OptEIA ELISA Sets, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) for interleukins 10 (IL-10) and 1β (IL-1β) and the inflammatory markers interferon γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α). These kits contained all necessary reagents to develop the immunoassays for each of the selected markers. For each evaluation (i.e. sample of one patient at determined period of evaluation), the tests were realized in triplicate, using 100 µL of sera for each well. Following the specifications of the reagent-set kit manufacturer, results were obtained using a spectrophotometer, with readings being performed at 450 nm within 30 min with λ correction 570 nm.

Data Analysis

Descriptive analysis of data was expressed as means and standard deviations. Commercially available software (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) was utilized to compare the evaluated parameters means and draw the graphics. Data was subjected to normality test analysis (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). For all evaluated parameters, data were not normally distributed, and therefore Kruskal-Wallis followed by Dunns post test was used for multiple comparisons, and Wilcoxon's test was used for paired

comparisons. All exams were made in triplicate and an average was used to represent the exam/patient. Statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

During the post-operative period, one block graft became exposed (30 days after surgery) and four grafts were lost, in four different patients, in the AL group (the grafted region still presented inflammation signs 60 days after surgery, and using a surgical approach it was seen that the fixation screw of the grafts was loosened). The loosened blocks were removed, and the treatment plan of those patients was changed, with implants being placed in alternative positions. These patients were maintained in the study sample since they all had more than one AL block grafted. The patient with the exposed block was instructed to apply chlorhexidine 1% gel over the exposed area twice a day for 14 days, and after that the graft was again covered by soft tissue, and proceeded presenting clinical signs of normality until the placement of the implant.

All achieved values analyzed were within those accepted as normal in literature. For all evaluated markers, and in all evaluated periods, inter-group comparison showed statistically similar results for both groups. Regarding intra-group comparison, for IL-10, no differences between the periods were seen inside each group. Opposing to that, AL group showed a statistically significant ($p < 0.01$) increase in the IL-1 β level from baseline to 30 days. Tumor necrosis factor α (TNF- α) also showed relevant ($p < 0.001$) increase from baseline to 90 and 180 days in allograft treated group, and IFN- γ showed intercalated results, with a decrease from baseline to 14 days ($p < 0.05$), increase from 14 to 90 days

($p < 0.001$) and another decrease from 90 to 180 days. These results are expressed in **Table 1** and **Figures 2 - 5**.

Discussion

In literature, the number of papers regarding the use of fresh-frozen bone allografts (AL), as a substitute to autologous bone (AT), has increased in the last years. This boost is principally related to the fact that, using AL as an alternative grafting material, problems such as the necessity of a second surgical (donor) site and the limited quantity of available bone in intraoral donor sites²⁰ are avoided.⁴⁵

Scientific evidence regarding the biological behavior of AL grafts is still insufficient and controversial. Some recent studies have reported that allogeneic fresh-frozen bone may provide clinical results equivalent to those achieved with autologous bone grafts.^{20, 46, 47} Some others address higher resorption rates of AL grafts⁴⁸, slower biological incorporation⁴⁹ and worse long-term survival rates of subsequently inserted implants^{20, 33}, when compared to AT grafts.

One of the major concerns regarding the use of AL grafts is its possibility of antigenicity and the risk of disease transmission.³⁶ Although there are studies stating that the risk of diseases transmission and crossed contamination for patients treated with AL grafts is minimal (considering bone-tissue banks which work based into de AATB standard protocols)²⁹, there is little information regarding specific immunological parameters, such as the antigenicity of this biomaterial. In this issue, bone allografts are habitually considered as a universal donor material, which has a diminished immunologic potential – connected to the processing of the tissue.^{28, 40, 50}

Older papers in literature do not correlated the use of large AL orthopedic grafts to severe marked immune responses, although these results are not long-term based and still with unclear clinical significance.^{51 28, 40, 50, 52} A recent study⁴¹, based on the screening of the blood cell profile of patients who went through bone-grafting surgery with AL, which could be directly connected to any current foreign-body reaction toward the grafted material^{42, 43, 53} showed that both autologous and fresh-frozen bone allografts did not cause any impairment in the red and white blood-cell balance, based on quantitative hemogram analysis, in patients subjected to maxillary reconstruction, which could be connected to the absence of immune response toward the grafts.

A recent literature review⁵⁴ states that there is evidence of specific immune responses to fresh-frozen bone allografts in human studies, that may arise from vital cells that escape the freezing process.⁵⁵ This immune responses could lead to different processes, from graft resorption, to its incomplete incorporation, fracture or non-union.⁵⁶

The immune response to a bone allograft may be triggered by many different bone components, such as collagen, fat, or matrix proteins, being correlated to the presence of human leukocyte antigen (HLA) mismatching.⁵⁴ HLA is subdivided into class I and class II antigens, and both are capable of activating T cells. Class I antigens include the HLA-A, HLA-B and HLA-C loci and are found in most nucleated cells.⁵⁷ Class II antigens are represented by the HLA-D locus and are expressed on B cells, cells of the reticuloendothelial system, activated T cells, and cells of the macrophage/ myeloid lineage. Human osteoblasts also express class II antigens.⁵⁸ Abnormal activity of these cell populations could be

associated to altered seric levels of the selected markers, evidencing interference of the grafting material in patients' immune system.

In the present study, a quantitative evaluation of interleukins 10 (IL-10) and 1 β (IL-1 β) and the inflammatory markers interferon γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α), in patients submitted to bone grafting procedures using AL and AT, evaluated the systemic immune impact of these grafting procedures. Our results, showed that all treated patients presented good systemic health after the bone-grafting procedures, without any signs of contamination or immunological incompatibility problems, indicated by the normality in the systemic levels of the evaluated markers.

Although for all evaluated markers, and in all evaluated periods, inter-group comparison showed statistically similar results for both groups, the intra-group differences found considering the different periods for AL-treated group, when IL-1 β , TNF- α and IFN- γ were focused, must be further addressed in literature. The selected markers can be directly and indirectly involved in the activation of cells capable of bone resorption (osteoclasts), and this information can be directly correlated to the fate of AL bone grafts. A recent tomographic evaluation⁴⁸, conducted using the very same population included in this study, showed higher resorption rates connected to AL grafts compared to AT, which might be connected to this immunologic variation.

The selected pool of systemic markers was chosen based on the reaction that might be initiated by the recipient against a graft, called the alloimmune response, mediated by a variety of cells and cytokines.⁵⁴

Between those cells, T cells also might play a vital role in both acute and chronic bone allograft rejection.⁵⁹ T cells secrete several cytokines that directly influence

bone physiology, and they are differentiated into inflammatory CD4 T cells (TH1) and helper CD4 T cells (TH2). From the evaluated markers, TH1, or inflammatory T cells, secrete $\text{TNF-}\alpha$, and $\text{IFN-}\gamma$.⁶⁰ $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IFN-}\gamma$ enhance the effect of macrophages on bone by promoting the activation and growth of monocytes and their differentiation into macrophages.⁶⁰

TH2 cells, also known as helper CD4 T cells, play a foremost role in initiating allograft rejection.⁶¹ Among others, these cells secrete IL-10, which is involved in the activation and full maturation of CD8+ T cells, plasma cells, and macrophages.⁶⁰ CD8 T cells are predominantly cytotoxic and play an important role in allograft rejection⁵⁴ recognizing antigens in association with MHC class I molecules, and also mediating cytotoxicity through secretion of $\text{IFN-}\gamma$, amid others, with the capacity to induce apoptosis in their target cells.⁶² Following this sequence of events, it is plausible that altered systemic levels of these markers would be related to an immune reaction against the grafts in the included patients.

Macrophages would also be an important cell population that could be involved in this adverse reaction, infiltrating fresh bone allografts and leading to an adverse effect since it they promote osteoclastogenesis and inhibit osteoblastic activity.⁶³ The evaluation of the systemic levels of IL-1 β and $\text{TNF-}\alpha$ could elicit this effect. These markers, if in excessive levels, would be able to initiate osteoclasts activation and therefore the resorption of the grafts, based on the knowledge that they could act promoting osteoclastogenesis by either acting directly on osteoclast precursor cells or stimulating RANKL (nuclear factor κ B ligand) expression, also stimulating osteoclastic bone resorption.⁶⁴ Inhibition of osteoblastic activity is based on the fact that IL-1 and $\text{TNF-}\alpha$ inhibit collagen

synthesis in osteoblasts and TNF- α downregulates their differentiation from precursor cells.⁶⁴ In view of this, it is clear that the evaluated immune markers could be used to systemically identify impairments in the immune response toward the grafts used in the study.

CONCLUSION

Considering these results and based on the limitations of the evaluation model that was used, it is concluded that none of the tested grafting materials negatively influenced the systemic levels of the evaluated markers, although the clinical impact of the intra-group differences found for AL-treated group must be investigated in further studies.

Acknowledgements

This study was financed by the Brazilian agencies Fapesp (2008/09207-9), CAPES (0050/10-5) and CNPq (scholarship).

References

1. Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y, Tsuru H. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study. *J Prosthet Dent* 1992; **68**: 813-816.
2. Sahin S, Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. II: A morphometric evaluation after three months of loading. *J Prosthet Dent* 1996; **76**: 176-180.
3. Wadamoto M, Akagawa Y, Sato Y, Kubo T. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. I: A morphometric evaluation in initial healing. *J Prosthet Dent* 1996; **76**: 170-175.
4. Renouard F, Nisand D. Impact of implant length and diameter on survival rates. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17 Suppl 2**: 35-51.

5. Wiens JP. The use of osseointegrated implants in the treatment of patients with trauma. *J Prosthet Dent* 1992; **67**: 670-678.
6. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987: 7-16.
7. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty* 1993; **4**: 58-63.
8. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics* 1994; **17**: 809-810, 821.
9. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17 Suppl 2**: 136-159.
10. Nowzari H, Aalam AA. Mandibular cortical bone graft part 2: surgical technique, applications, and morbidity. *Compend Contin Educ Dent* 2007; **28**: 274-280; quiz 281-272.
11. Donovan MG, Dickerson NC, Hanson LJ, Gustafson RB. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; **52**: 588-594.
12. Capelli M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; **23**: 277-285.
13. Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent* 1995; **4**: 261-267.
14. Donovan MG, Dickerson NC, Mitchell JC. Calvarial bone harvest and grafting techniques for maxillary and mandibular implant surgery. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 1994; **2**: 109-122.
15. Keller EE, Triplett WW. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1987; **45**: 11-14.
16. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 28-42.
17. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; **18**: 187-196.
18. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics* 2004; **27**: 488-495; quiz 496-487.

19. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent* 2003; **12**: 217-226.
20. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; **25**: 525-531.
21. Zerbo IR, de Lange GL, Joldersma M, Bronckers AL, Burger EH. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2003; **14**: 759-766.
22. Theler JM. Bone tissue substitutes and replacements. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011.
23. Goodman SB. Allograft alternatives: bone substitutes and beyond. *Orthopedics* 2010; **33**: 661.
24. Bayerlein T, Mundt T, Mack F, Bienengraber V, Proff P, Gedrange T. Bone graft substitutes in periodontal and peri-implant bone regeneration. *Folia Morphol (Warsz)* 2006; **65**: 66-69.
25. Collins M, James DR, Mars M. Alveolar bone grafting: a review of 115 patients. *Eur J Orthod* 1998; **20**: 115-120.
26. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 292-298.
27. Lee DW, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Kim TI. Bone regeneration effects of human allogeneous bone substitutes: a preliminary study. *J Periodontal Implant Sci* 2010; **40**: 132-138.
28. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005; **16**: 981-989.
29. Contar CM, Sarot JR, Bordini J, Jr., Galvao GH, Nicolau GV, Machado MA. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**: 1280-1285.
30. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 69-86.
31. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am* 1982; **64**: 270-279.

32. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990; **14**: 243-248.
33. Carinci F, Brunelli G, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmer L. A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010; **12**: 91-98.
34. Bach DE, Burgess LP, Zislis T, Quigley N, Hollinger JO. Cranial, iliac, and demineralized freeze-dried bone grafts of the mandible in dogs. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; **117**: 390-395.
35. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1983: 15-21.
36. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br* 1999; **81**: 333-335.
37. Bui MM, Smith P, Agresta SV, Cheong D, Letson GD. Practical issues of intraoperative frozen section diagnosis of bone and soft tissue lesions. *Cancer Control* 2008; **15**: 7-12.
38. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am* 1989; **24**: 891-905.
39. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 1987; **69**: 786-790.
40. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000: 10-27.
41. Spin-Neto R, Coletti FL, Pereira LAVD, Marcantonio E, Marcantonio E, Jr. Is peripheral blood-cell balance altered by the use of fresh frozen bone block allografts in lateral maxillary ridge augmentation? *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; **In Press**.
42. Esposito S. Immune system and surgical site infection. *J Chemother* 2001; **13 Spec No 1**: 12-16.
43. Maggini J, Raiden S, Salamone G, Trevani A, Geffner J. Regulation of neutrophil apoptosis by cytokines, pathogens and environmental stressors. *Front Biosci* 2009; **14**: 2372-2385.
44. American Association of Tissue Banks. 16th Annual meeting. August 24-26, 1992. Abstracts. *Transfusion* 1993; **33**: 610-621.

45. Perrott DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; **21**: 260-265.
46. Carinci F, Brunelli G, Zollino I, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmer L. Mandibles grafted with fresh-frozen bone: an evaluation of implant outcome. *Implant Dent* 2009; **18**: 86-95.
47. Carinci F, Guidi R, Franco M, Viscioni A, Rigo L, De Santis B, Tropina E. Implants inserted in fresh-frozen bone: a retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence Int* 2009; **40**: 413-419.
48. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Violin LAVD, Marcantonio Jr. E, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res* 2011; **In Press**.
49. Spin-Neto R, Del Barrio RAL, Violin LAVD, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio Jr. E. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; **In Press**.
50. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999; **30**: 571-581.
51. Stevenson S, Li XQ, Davy DT, Klein L, Goldberg VM. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. *J Bone Joint Surg Am* 1997; **79**: 1-16.
52. Stevenson S, Li XQ, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1991; **73**: 1143-1156.
53. Murray CA, DeKoven J, Spaner DE. Foreign body granuloma: a new manifestation of immune restoration syndrome. *J Cutan Med Surg* 2003; **7**: 38-42.
54. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2010; **10**: 885-901.

55. VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* 2005; **23**: 1059-1064.
56. Hubble MJ. Bone grafts. *Surg Technol Int* 2002; **10**: 261-265.
57. Nelson KA. Human leukocyte antigen system and the immune response to it. *Clin Orthop Relat Res* 1996: 35-42.
58. Skjodt H, Hughes DE, Dobson PR, Russell RG. Constitutive and inducible expression of HLA class II determinants by human osteoblast-like cells in vitro. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1421-1426.
59. Muscolo DL, Ayerza MA, Calabrese ME, Redal MA, Santini Araujo E. Human leukocyte antigen matching, radiographic score, and histologic findings in massive frozen bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1996: 115-126.
60. Horowitz MC, Friedlaender GE, Qian HY. The immune response: the efferent arm. *Clin Orthop Relat Res* 1996: 25-34.
61. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J Exp Med* 1996; **184**: 2013-2018.
62. Apasov S, Redegeld F, Sitkovsky M. Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 404-410.
63. Horowitz MC, Friedlaender GE. Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am* 1991; **73**: 1157-1168.
64. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008; **29**: 403-440.

Figure legends

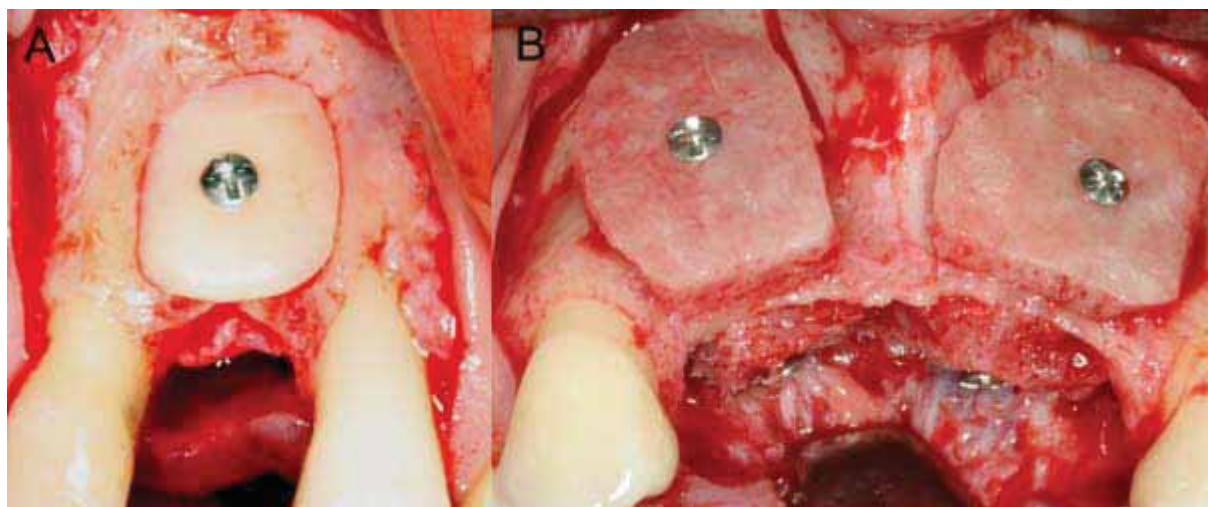


Figure 1 – (A) A case treated with autologous bone graft and (B) a case treated with fresh-frozen bone allografts, at the time of placement of the grafts.

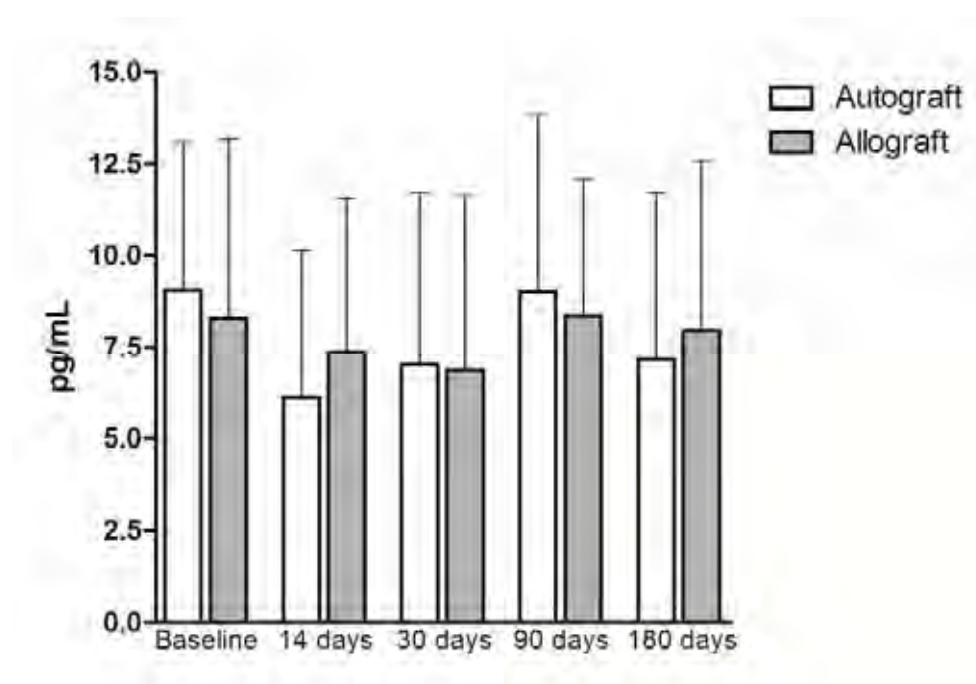


Figure 2 – Determination of Interleukin 10 (pg/mL) levels. The determination was realized by immunoenzymatic assay (ELISA). The results were expressed in means and standard deviations.

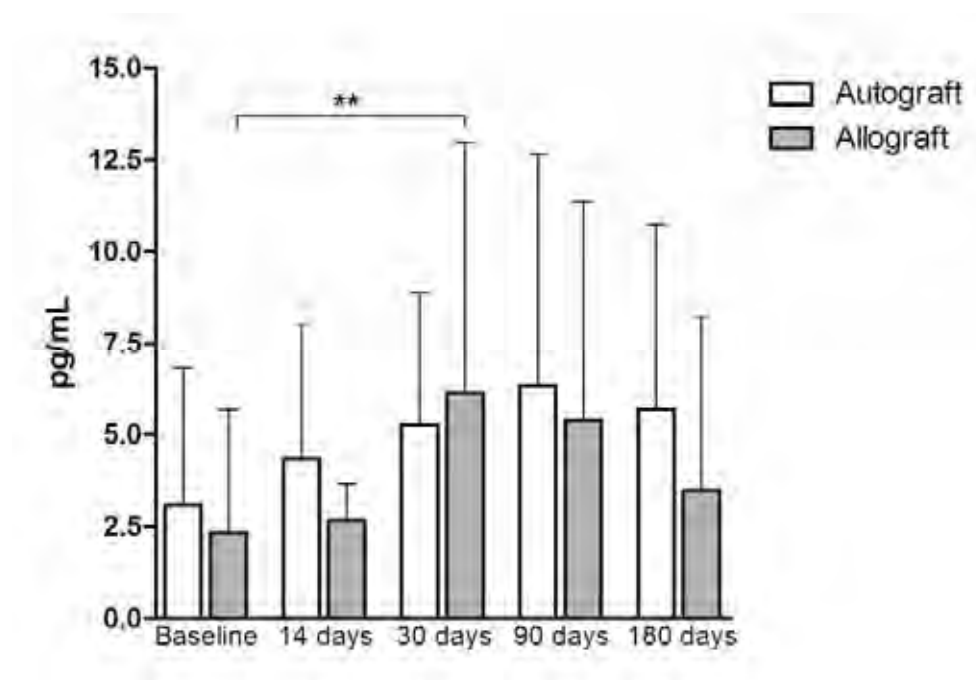


Figure 3 – Determination of Interleukin 1 β (pg/mL) levels. The determination was realized by immunoenzymatic assay (ELISA). The results were expressed in means and standard deviations. (**) $p \leq 0.01$.

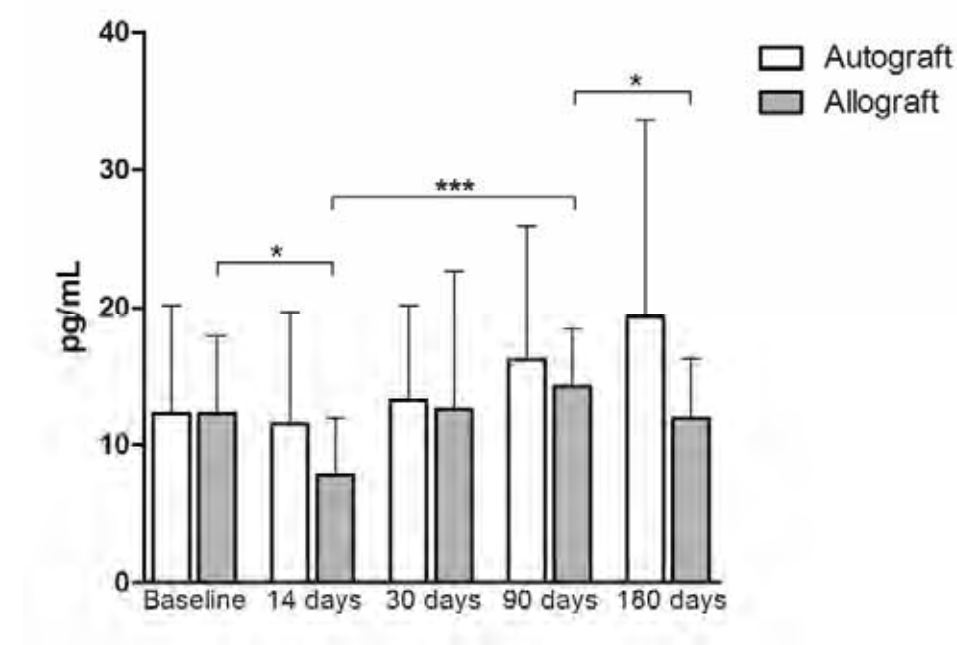


Figure 4 – Determination of Interferon γ (pg/mL) levels. The determination was realized by immunoenzymatic assay (ELISA). The results were expressed in means and standard deviations. (*) $p \leq 0.05$ and (***) $p \leq 0.001$.

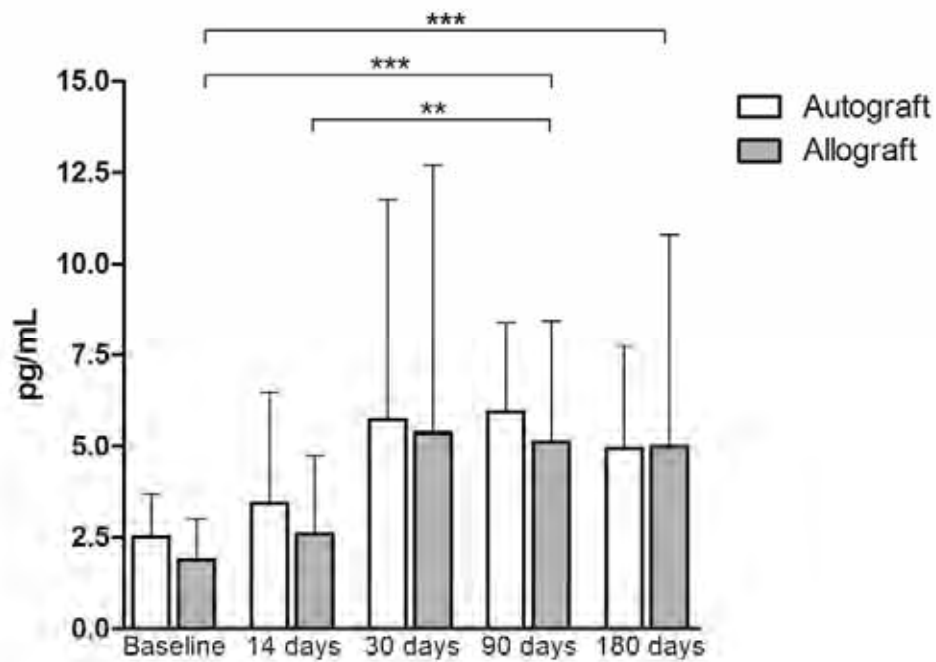


Figure 5 – Determination of and Tumor Necrosis Factor α (pg/mL) levels. The determination was realized by immunoenzymatic assay (ELISA). The results were expressed in means and standard deviations. (*) $p \leq 0.05$ and (***) $p \leq 0.001$.

Table 1 – Interleukin 6, Interleukin 1 β , Interferon γ and Tumor necrosis factor α levels, expressed in means and standard deviations

Variable	Baseline		14 days		30 days		90 days		180 days	
	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft	Allograft	Autograft
IL-10	8.31 $\pm$ 4.87	9.08 $\pm$ 4.03	7.38 $\pm$ 4.17	6.12 $\pm$ 4.03	6.87 $\pm$ 4.78	7.01 $\pm$ 4.72	8.36 $\pm$ 3.72	9.03 $\pm$ 4.81	7.95 $\pm$ 4.63	7.17 $\pm$ 4.56
IL-1 β	2.32 $\pm$ 3.36	3.08 $\pm$ 3.73	2.65 $\pm$ 1.01	4.34 $\pm$ 3.70	6.14 $\pm$ 6.85	5.26 $\pm$ 3.64	5.40 $\pm$ 5.97	6.34 $\pm$ 6.33	3.48 $\pm$ 4.77	5.69 $\pm$ 5.03
IFN- γ	12.25 $\pm$ 5.66	12.29 $\pm$ 7.87	7.80 $\pm$ 4.10	11.52 $\pm$ 8.08	12.57 $\pm$ 10.09	13.18 $\pm$ 6.98	14.20 $\pm$ 4.19	16.15 $\pm$ 9.79	11.91 $\pm$ 4.29	19.24 $\pm$ 14.35
TNF- α	1.88 $\pm$ 1.12	2.51 $\pm$ 1.18	2.58 $\pm$ 2.17	3.42 $\pm$ 3.04	5.35 $\pm$ 7.36	5.72 $\pm$ 6.04	5.11 $\pm$ 3.34	5.92 $\pm$ 2.47	4.99 $\pm$ 5.81	4.94 $\pm$ 2.80

IL-10 – Interleukin 10 (pg/mL); IL-1 β – Interleukin 1 β (pg/mL); IFN- γ – Interferon γ (pg/mL); TNF- α - Tumor necrosis factor α (pg/mL).

6 DISCUSSÃO

O uso de enxertos ósseos homólogos, obtidos de bancos de tecido músculo-esqueléticos, aumentou consideravelmente nos últimos anos, bem como o número de artigos na literatura enfocando seu uso na Ortopedia e Odontologia^{6, 13, 22}.

As vantagens que levaram o osso homólogo a ser considerado uma alternativa clínica viável para os procedimentos de enxertia óssea maxilar são relacionadas principalmente à ausência da necessidade de criação de um segundo sítio cirúrgico para captação de material, contornando aquela que seria a maior desvantagem relacionadas aos enxertos autólogos^{44, 53}.

Apesar da efervescência científica sobre o tema nos últimos anos, as evidências sobre o comportamento biológico do biomaterial homólogo continuam insuficientes e controversas, com elogios e críticas ao material sendo encontrados simultaneamente^{11, 12, 53}. Tópicos como maiores taxas de reabsorção, incorporação lenta, baixas taxas de sucesso na instalação de implantes nas áreas enxertadas^{10, 22, 32, 47, 48, 53}, além da preocupação com a transmissão cruzada de doenças e antigenicidade do material enxertado⁴³, são rotineiramente associados ao biomaterial homólogo.

Em nosso estudo, o método de avaliação tomográfico foi empregado para elucidar quantitativamente as taxas de reabsorção do material homólogo em relação ao padrão ouro – o osso autólogo. Nossos

resultados tomográficos demonstraram que ambos os materiais estudados foram capazes de promover um aumento ósseo compatível com a devolução da anatomia óssea necessária à instalação de implantes, embora, é claro, sem fornecer subsídio sobre a qualidade do tecido ósseo presente na região.

Nossos resultados demonstraram ainda que os blocos ósseos homólogos apresentam a tendência de ser mais volumosos do que os blocos autólogos que são obtidos dos próprios pacientes (de acordo com a vantagem clínica citada para o uso desse biomaterial), característica essa que, ao longo dos seis primeiros meses pós-operatórios é prejudicada pela maior taxa de reabsorção apresentada por esses enxertos, próxima dos 10%, em média. Essa informação é relevante e deve ser considerada no planejamento reverso que deve ser feito em cada caso.

Um parâmetro que foi considerado como causador dessa maior taxa de reabsorção observada para o material homólogo foi a arquitetura do osso utilizado. O fato de utilizarmos um enxerto homólogo córtico-medular, em comparação ao enxerto ósseo autólogo com maior conteúdo cortical, pode ter interferido em nossos resultados, embora o material homólogo tenha sido trabalhado de forma a minimizar o seu conteúdo esponjoso. Estudos prévios já demonstraram a interferência da arquitetura do enxerto ósseo utilizado na dinâmica de sua remodelação³. Outro fator que pode ter interferido para que houvesse essa maior perda volumétrica

quando o biomaterial homólogo foi utilizado seria a dificuldade de vascularização que esse biomaterial apresenta, levando à um menor crescimento ósseo em direção à área enxertada, e a um menor número de células envolvidas no processo de remodelação²⁴⁻²⁶.

Em relação ao método tomográfico, é importante frisar que atenção especial foi dada à sua padronização, garantindo a reprodutibilidade e o poder estatístico de nossos resultados. Embora a tomografia computadorizada venha sendo utilizada exaustivamente para estudo aonde se deseja avaliar volume ósseo, até então isso foi feito de maneira pouco padronizada, prejudicando o peso científico dos achados desses estudos^{1, 14, 23, 42, 50-52}.

Tão relevante quanto uma taxa de reabsorção aumentada, a incorporação lenta do biomaterial homólogo também é fator de preocupação. A literatura estabelece que o simples processamento ao qual esse biomaterial é submetido, que envolve uma lavagem por antibióticos e o congelamento, já diminui consideravelmente as propriedades biológicas deste substituto ósseo^{8, 31}. Nossos resultados histológicos demonstraram que, apesar de biocompatível, o biomaterial homólogo demonstrou taxa de remodelação consideravelmente mais lenta, com quantidades variáveis – e em alguns casos extensas – de osso ainda necrótico (que não foi remodelado), quando da reabertura para instalação de implantes. Muitos artigos na literatura apresentam resultados diversos dos demonstrados neste estudo^{28-30, 45}, porém

também não são incomuns resultados semelhantes aos aqui demonstrados²⁴⁻²⁶. Para os enxertos ósseos autólogos, a quantidade de osso necrótico era consideravelmente inferior, em acordo com o que é citado na literatura⁵⁵.

Essa característica de remodelação mais lenta, além de interferir na cronologia da reabilitação dos pacientes tratados com material homólogo pode ainda interferir negativamente no longo termo da utilização clínica deste biomaterial. Como a plasticidade da região enxertada fica diminuída pela presença de grandes quantidades de osso ainda necrótico, o acúmulo de micro-fraturas que ocorre após o carregamento biomecânico deste biomaterial pode resultar em fraturas ou solturas de bloco, diminuindo o seu índice de sucesso em longo prazo¹⁵, e podendo interferir até mesmo na manutenção da osseointegração de implantes instalados nessas áreas¹⁰. O material homólogo córtico-medular apresentou características histológicas que indicaram que seu processo de remodelação é mais rápido do que o material homólogo cortical, porém ainda inferior quando comparado ao osso autólogo. Usando-se a mesma premissa científica apresentada para ratificar nossos achados tomográficos, a diferença da arquitetura do enxerto ósseo utilizado realmente influenciou na dinâmica de sua remodelação³.

Além das características biológicas relacionadas à remodelação do biomaterial homólogo, os riscos imunológicos relacionados ao seu uso também são fatores relevantes. Embora freqüentemente tratados como

um material doador universal, cujo potencial imunológico é diminuído pelo processamento, as informações sobre esse tema ainda são escassas na literatura^{2, 4, 17, 2, 4, 17, 43}.

Em nosso estudo, duas metodologias foram empregadas para obter informações nesse sentido. A primeira delas foi a identificação do perfil de células sanguíneas dos pacientes submetidos à cirurgia de enxertia. A análise dos constituintes do sangue (eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas) pode identificar alterações patológicas no organismo, desde que associada à um acompanhamento longitudinal e com a presença de um grupo controle bem definido.⁴¹ No nosso caso, como buscávamos especificamente qualquer indício de reação contra o enxerto, especial atenção foi dada ao leucograma, já que células como os linfócitos estão diretamente relacionadas a progressão de reações de corpo estranho⁴⁰.

Embora a relação entre a contagem das populações de células sanguíneas e a homeostase do sistema imune esteja bem definida na literatura^{18, 35}, não existiam na literatura dados específicos sobre essas contagens celulares em pacientes submetidos a enxertos ósseos maxilares. Nossos resultados não demonstraram alterações nas populações celulares sanguíneas tanto nos pacientes tratados com osso autólogo como nos tratados com osso homólogo, em relação ao fato dessas contagens populacionais sempre se apresentarem dentro dos

limites de normalidade, sem sinais de inflamação ou problemas de incompatibilidade imunológica.

Os valores encontrados para a população de linfócitos (dentro da normalidade) foram um bom preditivo de que reações imunológicas sistêmicas contra os enxertos, fossem autólogos ou homólogos, não estavam presentes, embora isso só esclarecesse parte da questão, sendo imperativo que estudos mais profundos, com base na detecção de algumas interleucinas ou citocinas inflamatórias específicas fossem feitos²¹.

No presente estudo, seguindo essa demanda lógica por resultados mais específicos, o soro dos pacientes também foi avaliado, através de uma quantificação de alguns marcadores imunológicos que pudessem indicar reação contra os enxertos. Foram selecionadas as interleucinas 10 (IL-10) e 1 β (IL-1 β), além do interferon γ (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α), e que foram avaliados em cinco diferentes períodos pós-enxertia, seguindo a mesma cronologia de avaliação feita em relação aos hemogramas.

Nossos resultados demonstraram igualdade estatística entre os grupos estudados, para todos os marcadores avaliados, e em todos os períodos de avaliação. Porém, durante a avaliação intra-grupos, diferenças foram encontradas para o grupo tratado com o biomaterial homólogo, considerando a IL-1 β , o TNF- α e o IFN- γ , fato que deve ser cautelosamente considerado, já que tais marcadores estão direta e

indiretamente conectados a ativação de osteoclastos, podendo estar, por exemplo, relacionados à maior taxa de reabsorção óssea encontrada para o grupo tratado com osso homólogo comparativamente ao grupo tratado com osso autólogo.

A osseointegração de implantes nas áreas enxertadas com biomaterial homólogo também foi abordada. Recentemente, um estudo abordou o sucesso de implantes seguindo os quatro primeiros anos de sua implantação em áreas enxertadas com biomaterial homólogo, citando baixas taxas de sucesso longitudinal (na casa dos 40%) para tais regiões¹⁰. Em nosso estudo, foi feita uma avaliação histomorfométrica a curto prazo, pautada na cronologia de reabertura dos implantes para instalação de cicatrizadores (6 meses para maxila, 4 meses para mandíbula), e que mensurou a relação do tecido ósseo com os implantes inseridos sobre as regiões enxertadas com material autólogo e homólogo.

A literatura considera que as taxas de osseointegração, e em consequência, de sucesso longitudinal de implantes instalados em áreas enxertadas é reduzida, comparativamente às áreas não enxertadas⁴⁶. É importante salientar que a remodelação óssea mais lenta, associada ao biomaterial homólogo (conforme demonstrado em nossos resultados), pode interferir diretamente na osseointegração de implantes instalados em áreas enxertadas. Em nosso estudo, a avaliação em curto prazo dos parâmetros relacionados à osseointegração (contato osso implante e área óssea formada entre as roscas) dos mini-implantes instalados nas áreas

enxertadas demonstrou similaridade entre os grupos estudados, com os valores obtidos compatíveis ao sucesso do processo, em todas as regiões estudadas ao redor desses mini-implantes, e também de forma generalizada.

No entanto, se reunirmos as informações sobre a remodelação mais lenta dos enxertos homólogos (em comparação aos enxertos autólogos) e as menores taxas de sobrevivência em longo prazo relatadas para implantes instalados em áreas enxertadas⁴⁶, fica evidente que resultados como os de Carinci e colaboradores¹⁰, com uma baixa taxa de sucesso em longo prazo para implantes instalados em áreas enxertadas com biomaterial homólogo, podem ser biologicamente ratificado.

Em nosso estudo, a maior diferença entre os grupos estudados, em relação a algumas regiões específicas, tanto para o contato osso implante, como para a área óssea formada entre as roscas do mini-implante, embora sem significância estatística, revela que os efeitos desses eventos biológicos para os resultados clínicos em longo prazo, de implantes instalados em áreas enxertadas com biomaterial homólogo, ainda precisam ser melhor estudados, preferencialmente em estudos longitudinais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, frente à metodologia empregada permitiram concluir que:

1. Biologicamente, o enxerto ósseo homólogo mostrou-se inferior ao enxerto ósseo autólogo, com processo de incorporação mais lenta, comprovado pela presença de variáveis áreas de osso necrótico, no momento da reabertura para instalação de implantes, aos sete e aos seis meses pós-enxertia, para o material cortical e córtico-medular, respectivamente;

2. A avaliação em curto prazo dos parâmetros relacionados à osseointegração dos mini-implantes instalados nas áreas enxertadas demonstrou similaridade entre os grupos estudados, com os valores obtidos compatíveis ao sucesso do processo;

3. Apesar de ambos os biomateriais testados proporcionarem volume ósseo compatível à instalação de implantes, maior reabsorção óssea radiográfica foi observada para o grupo tratado com enxertos homólogos, aos seis meses pós-enxertia;

4. Nenhum dos biomateriais testados induziu alterações significativas nas populações celulares sanguíneas, considerando o

eritrograma, o leucograma e a contagem de plaquetas dos pacientes, durante os seis primeiros meses pós-enxertia;

5. Os níveis sistêmicos dos marcadores IL-10, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , nos seis primeiros meses pós-enxertia, foram estatisticamente iguais para ambos os grupos avaliados, embora para o grupo tratado com biomaterial homólogo diferenças entre os períodos de avaliação tenham sido encontradas para o IL-1 β , o TNF- α e o IFN- γ .

8 REFERÊNCIAS*

1. Acocella A, Sacco R, Niardi P, Agostini T. Early implant placement in bilateral sinus floor augmentation using iliac bone block grafts in severe maxillary atrophy: a clinical, histological, and radiographic case report. *J Oral Implantol*. 2009;35:37-44.
2. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000(371):10-27.
3. Bohner M, Loosli Y, Baroud G, Lacroix D. Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomater*. 2011;7:478-84.
4. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999;30:571-81.
5. Branemark PI, Albrektsson T. Titanium implants permanently penetrating human skin. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1982;16:17-21.
6. Bridwell KH, O'Brien MF, Lenke LG, Baldus C, Blanke K. Posterior spinal fusion supplemented with only allograft bone in paralytic scoliosis. Does it work? *Spine (Phila)*. 1994;19:2658-66.
7. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64:270-9.

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13:29-45.
9. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000. 1999;19:151-63.
10. Carinci F, Brunelli G, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, et al. A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010;12:91-8.
11. Carinci F, Brunelli G, Zollino I, Franco M, Viscioni A, Rigo L, et al. Mandibles grafted with fresh-frozen bone: an evaluation of implant outcome. *Implant Dent*. 2009;18:86-95.
12. Carinci F, Guidi R, Franco M, Viscioni A, Rigo L, De Santis B, et al. Implants inserted in fresh-frozen bone: a retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence Int*. 2009;40:413-9.
13. Carter G. Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J*. 1999;70(4):660-70; quiz 72-6.
14. Chadwick JW, Lam EW. The effects of slice thickness and interslice interval on reconstructed cone beam computed tomographic images. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110:e37-42.

15. Corsi KA, Schwarz EM, Mooney DJ, Huard J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. *J Orthop Res*. 2007;25:1261-8.
16. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982;11:318-26.
17. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg*. 2005;16:981-9.
18. Esposito S. Immune system and surgical site infection. *J Chemother*. 2001;13 Spec No 1:12-6.
19. Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:393-401.
20. Friedlaender GE. Bone banking. In support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1987(225):17-21.
21. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 6:232-41.
22. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
23. Gibaud B. The quest for standards in medical imaging. *Eur J Radiol*. 2011; 78:190-8.
24. Goldberg VM, Stevenson S. The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty*. 1993;4:58-63.

25. Goldberg VM, Stevenson S. Bone graft options: fact and fancy. *Orthopedics*. 1994;17:809-10, 21.
26. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res*. 1987(225):7-16.
27. Holmquist P, Dasmah A, Sennerby L, Hallman M. A new technique for reconstruction of the atrophied narrow alveolar crest in the maxilla using morselized impacted bone allograft and later placement of dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008;10:86-92.
28. Jensen J, Sindet-Pedersen S, Oliver AJ. Varying treatment strategies for reconstruction of maxillary atrophy with implants: results in 98 patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994;52:210-6; discussion 6-8.
29. Kahnberg KE, Nystrom E, Bartholdsson L. Combined use of bone grafts and Branemark fixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4:297-304.
30. Keller EE, Van Roekel NB, Desjardins RP, Tolman DE. Prosthetic-surgical reconstruction of the severely resorbed maxilla with iliac bone grafting and tissue-integrated prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987;2:155-65.
31. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent*. 2003;12:217-26.
32. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, banking, and transplantation of allograft tissues. *Nurs Clin North Am*. 1989;24:891-905.

33. Lillie RD. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York: The Blakiston Company;1954.
34. Longoni S, Sartori M, Apruzzese D, Baldoni M. Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22:478-83.
35. Maggini J, Raiden S, Salamone G, Trevani A, Geffner J. Regulation of neutrophil apoptosis by cytokines, pathogens and environmental stressors. *Front Biosci.* 2009;14:2372-85.
36. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res.* 1983(174):69-86.
37. Misch CE. Implant dentistry. *Dent Today.* 2002;21:62.
38. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop.* 1990;14:243-8.
39. Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in parffin. *J Dent Res* 1945;24:143-53.
40. Murray CA, DeKoven J, Spaner DE. Foreign body granuloma: a new manifestation of immune restoration syndrome. *J Cutan Med Surg.* 2003;7:38-42.

41. Nunes LA, Brenzikofer R, de Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol.* 2011; 110:191-8.
42. Oberoi S, Chigurupati R, Gill P, Hoffman WY, Vargervik K. Volumetric assessment of secondary alveolar bone grafting using cone beam computed tomography. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009;46:503-11.
43. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81:333-5.
44. Perrott DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1992;21:260-5.
45. Pikos MA. Buccolingual expansion of the maxillary ridge. *Dent Implantol Update.* 1992;3:85-7.
46. Rasmusson L, Thor A, Sennerby L. Stability Evaluation of Implants Integrated in Grafted and Nongrafted Maxillary Bone: A Clinical Study from Implant Placement to Abutment Connection. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011 May 11 [EPub ahead of print].
47. Spin-Neto R, Del Barrio RAL, Violin LAVD, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio Jr. E. Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011 Aug 11 [Epub ahead of print].

48. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Violin LAVD, Marcantonio Jr. E, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. Clin Oral Implants Res. 2011;In Press.
49. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. J Bone Joint Surg Br. 1989;71:677-80.
50. Verdugo F, D'Addona A, Ponton J. Clinical, Tomographic, and histological assessment of periosteal guided bone regeneration with cortical perforations in advanced human critical size defects. Clin Implant Dent Relat Res. 2010 11 May [Epub ahead of print].
51. Verdugo F, Simonian K, Nowzari H. Periodontal biotype influence on the volume maintenance of onlay grafts. J Periodontol. 2009;80:816-23.
52. Verdugo F, Simonian K, Smith McDonald R, Nowzari H. Quantitation of mandibular ramus volume as a source of bone grafting. Clin Implant Dent Relat Res. 2009;11 Suppl 1:e32-7.
53. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Implants. 2010;25:525-31.
54. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Implants Res. 2004;15:589-97.

55. Zerbo IR, de Lange GL, Joldersma M, Bronckers AL, Burger EH. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. Clin Oral Implants Res. 2003;14:759-66.

Anexos

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa

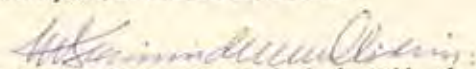


Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado *"ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓLOGOS EM HUMANOS: AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DE SUA INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE OSSEOINTEGRAR IMPLANTES"*, sob o protocolo nº 36/08, de responsabilidade do Pesquisador (a) **ELCIO MARCANTONIO JUNIOR**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled *"BONE ALLOGRAFTS IN HUMANS: IMMUNOLOGIC, TOMOGRAPHIC, HISTOLOGICAL AND HISTOMETRICAL EVALUATION OF ITS INCORPORATION AND CAPACITY OF IMPLANTS OSSEOINTEGRATION"*, protocol number 36/08, under Dr. **ELCIO MARCANTONIO JUNIOR**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 03 (three) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 24 de setembro de 2008.


Prof.ª Dr.ª Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓLOGOS EM HUMANOS: AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA, TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DE SUA INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE OSSEOINTEGRAR IMPLANTES”

Nome do pesquisador responsável: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Nome: _____ Idade: _____

RG: _____ Prontoário.Geral: _____ Telefone: _____

Endereço: _____ Cidade: _____

Responsável legal pelo paciente: _____

Idade: _____ RG: _____ Grau de parentesco: _____

Prova documental comprobatória da responsabilidade (Nos casos de autorização fornecida por responsável)

Eu estou ciente de que as pessoas que perdem os dentes apresentam, depois de um certo tempo, uma diminuição da quantidade de osso para a instalação de implantes dentários, os quais possibilitam a confecção de uma prótese onde antes isto não era possível. O tratamento da falta de osso pode ser feito por meio de enxerto de osso retirado do próprio paciente de áreas de dentro da boca (Osso autólogo) ou por meio da colocação de materiais que substituem o osso como o osso obtido em bancos de tecidos (Osso homólogo). Muitos estudos mostram que estes materiais são substâncias que se transformam em osso humano e não causam inflamação ou alergia, podendo ser usados com segurança em qualquer pessoa.

Assim sendo, fui informado sobre o objetivo desta pesquisa, que é avaliar, por meio de tomografias, exames de sangue e análise histológica, os resultados da cirurgia de enxerto ósseo autólogo e homólogo na região dento-maxilar. Para tanto, primeiramente, farei uma tomografia e um hemograma completo **uma semana antes** da cirurgia de colocação do enxerto, para delimitação da quantidade de osso disponível e avaliação de minhas condições sistêmicas. Após 15 dias, 1 mês, 3 meses e 6 meses, farei um novo hemograma, para avaliação sistêmica. No momento da cirurgia de implantes, após **8 meses** da cirurgia de enxerto, nova tomografia será feita para avaliar o resultado da cirurgia de enxerto, e saber se transformou-se em osso. Nesse momento, será colhida, por meio de biópsia, uma pequena quantidade de osso, na região próxima à de preparação para colocação do implante, e também será feita a instalação de um mini-implante, sem prejuízo algum para o tratamento reabilitador. **Seis meses após a instalação dos implantes**, no momento da reabertura para instalação dos cicatrizadores, nova tomografia será feita para avaliar o resultado da cirurgia de implantes, e será colhido, por meio de biópsia, o mini-implante instalado, sem prejuízos à reabilitação ou aumento do procedimento cirúrgico.

Esse procedimento de biópsia, não acarreta nenhuma agressão física, não aumenta o desconforto pós-operatório, não altera o planejamento cirúrgico dos implantes ou maior perda de osso na região, pois será realizado na região que já seria removido para posicionamento do implante. Para participar da pesquisa deverei retornar à Faculdade para controles cirúrgicos e novas avaliações.

Também fui informado sobre a possibilidade de ocorrer transtornos durante ou após a cirurgia. Essa possibilidade é pequena, mas pode haver, em casos raros, falta de integração do enxerto, reações inflamatórias e/ou infecciosas material de enxerto, ao anestésico local ou à medicação prescrita após a cirurgia. **Nesses casos, sei que terei integral acompanhamento feito pelos profissionais responsáveis pela pesquisa, e também que meu plano de tratamento será refeito, novos enxertos serão realizados, e que serei acompanhado atentamente até o final de meu tratamento.**

O pesquisador responsável pela pesquisa bem como os demais profissionais responsáveis pelo tratamento em questão se comprometem a dar resposta a qualquer pergunta e esclarecimento a qualquer dúvida relacionada. Sei que posso deixar de participar da pesquisa a qualquer tempo, sem prejuízo do atendimento, cuidados e tratamento pela equipe da especialidade da FOAr-UNESP. O sigilo e o caráter confidencial das informações serão mantidos, zelando pela minha privacidade e garantindo que minha identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

Nome do pesquisador : Rubens Spin Neto

Nome do responsável pela equipe cirúrgica: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Jr

Nome do orientador geral da pesquisa: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Jr

Telefone para contato: 3301-6369/9106-9157

Telefone do Comitê de Ética: 3301-6434/3301-6432

Assinatura do profissional responsável

Assinatura do paciente

Araraquara, ____/____/____